

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**SNAIL2: ESTUDIOS ESTRUCTURA-FUNCIÓN Y ANÁLISIS *IN VIVO* DE SU PAPEL EN EL
DESARROLLO DEL FOLÍCULO PILOSO Y LA CARCINOGENESIS QUÍMICA DE PIEL.**

ANA VILLAREJO NIETO

Madrid, 2014

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**SNAIL2: ESTUDIOS ESTRUCTURA-FUNCIÓN Y ANÁLISIS *IN VIVO* DE SU PAPEL EN EL
DESARROLLO DEL FOLÍCULO PILOSO Y LA CARCINOGENÉISIS QUÍMICA DE PIEL.**

Ana Villarejo Nieto

Licenciada en Farmacia,

presenta esta memoria para optar al título de Doctor

por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de tesis:

Dra. Amparo Cano García, Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Francisco Portillo Pérez, Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

La presente tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica (Facultad de Medicina, UAM) y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid (CSIC-UAM), y financiada por una Beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Madrid, 2014



Dra. Amparo Cano García

Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Francisco Portillo Pérez

Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN QUE:

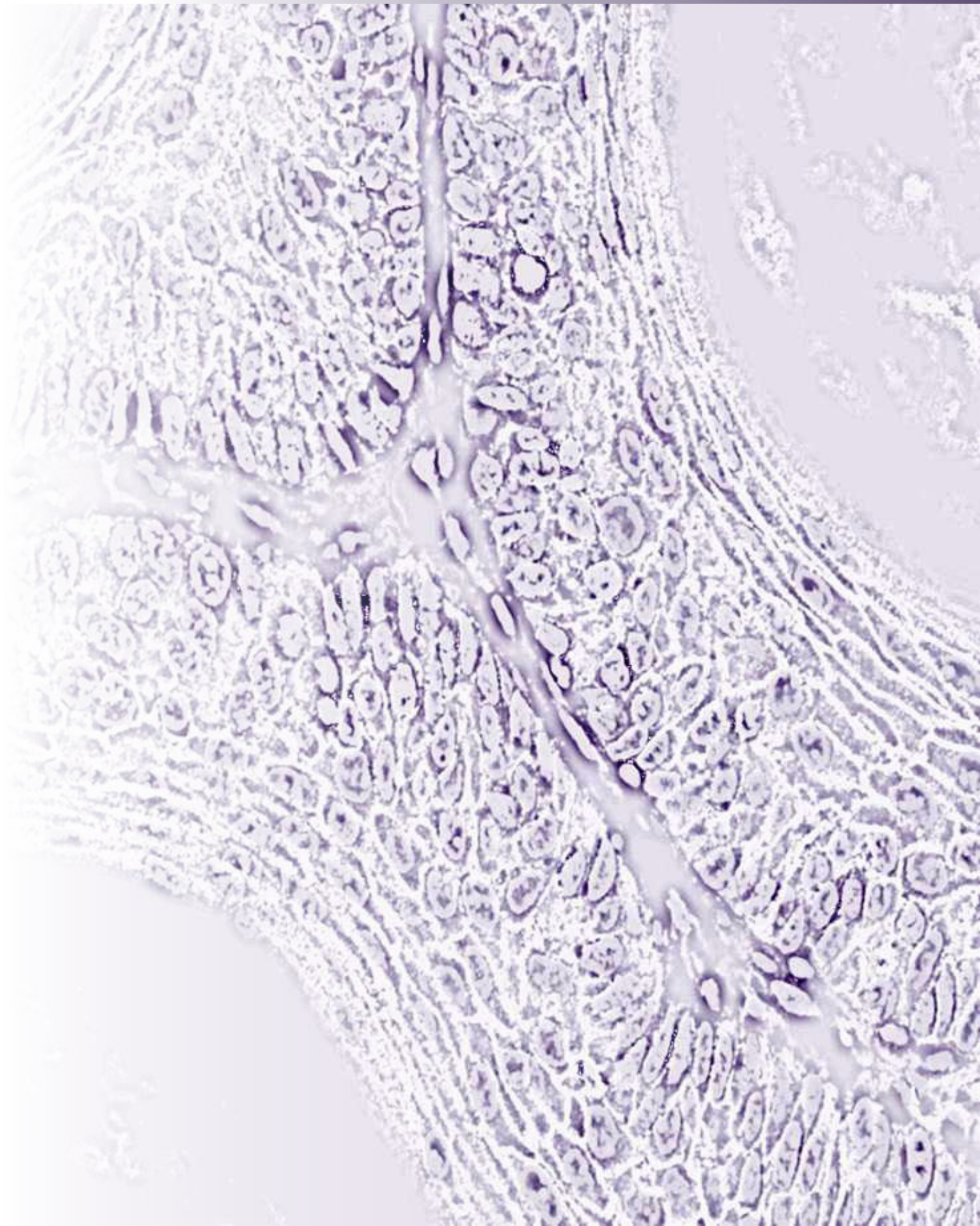
Ana Villarejo Nieto, Licenciada en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina – Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) de Madrid, el trabajo titulado “Snail2: Estudios estructura-función y análisis *in vivo* de su papel en el desarrollo del folículo piloso y la carcinogénesis química de piel”.

El presente trabajo cumple, a nuestro juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Madrid, 1 de Septiembre de 2014

Fdo. **Dra. Amparo Cano García**

Fdo. **Dr. Francisco Portillo Pérez**



Snail1 y Snail2 son factores de transcripción de dedos de zinc (ZFs) de la superfamilia Snail que se caracterizan por su capacidad para inducir el proceso denominado transición epitelio-mesénquima (TEM), el cual es de gran importancia en desarrollo embrionario y en determinadas situaciones patológicas como la progresión tumoral. Un evento clave durante la TEM es la pérdida de expresión de *cadherina-E*, que ocurre fundamentalmente por represión transcripcional. El promotor de *cadherina-E* presenta unas regiones denominadas cajas-E a las que son capaces de unirse diversos factores de transcripción, entre los que se encuentran Snail1 y Snail2. Ambos factores presentan un dominio conservado N-terminal SNAG; una región central divergente que en Snail1 está formada por una caja de destrucción (DB) y secuencias de exportación nuclear (NES), mientras que Snail2 presenta un dominio SLUG y un dominio de interacción con CtBP (CID) degenerado; y una región de unión al DNA (DBD), formada por cuatro y cinco ZFs en Snail1 y Snail2, respectivamente. Análisis previos de expresión génica evidenciaron que Snail1 y Snail2 inducen programas genéticos comunes y específicos a cada factor, pero no se conoce en detalle los motivos de dichas diferencias.

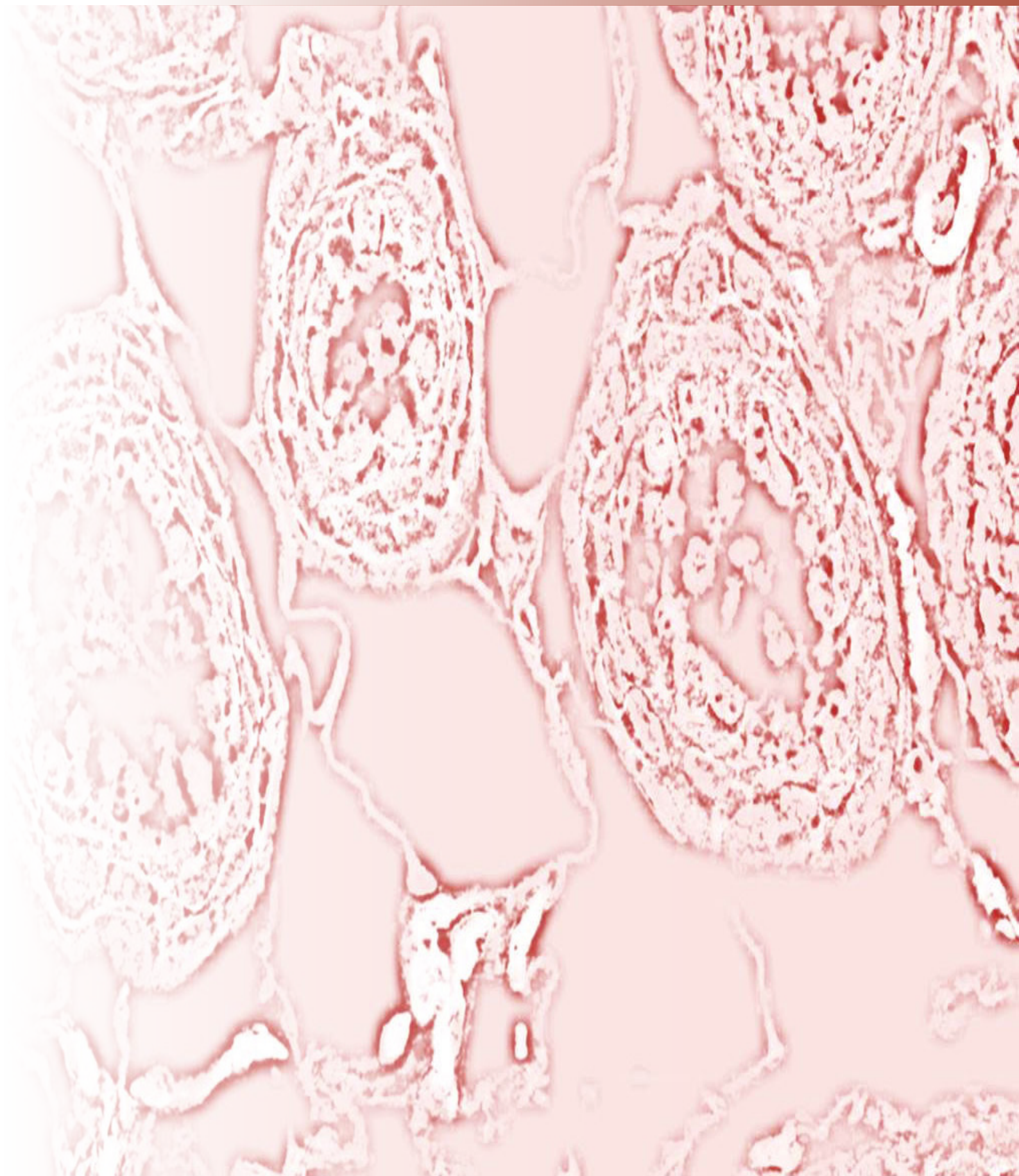
Esta tesis ha analizado la contribución de cada uno de los ZFs de Snail1 y Snail2 a su capacidad represora y funcionalidad, la relevancia de los dominios SNAG y SLUG de Snail2, así como el papel en concreto de Snail2 en el ciclo del folículo piloso (FP) y en el desarrollo de las lesiones en el proceso de carcinogénesis química. El análisis de los ZFs de Snail1 y Snail2 se basó en el estudio de su capacidad represora sobre *cadherina-E* y de inducción de TEM, y demostramos que los ZFs necesarios para su función son diferentes en estos dos factores. En el caso de Snail1, se requiere que esté intacta la estructura del primer (ZF1) y el segundo dedo de zinc (ZF2) conjuntamente, mientras que en Snail2 son el ZF3 o ZF4 los esenciales para su función. Adicionalmente, caracterizamos el dominio SNAG de Snail2 como fundamental para la inducción de TEM, siendo relevante la fosforilación de la serina 4 en dicha capacidad, mientras que la presencia del dominio SLUG modula negativamente la inducción de TEM.

El estudio de la relevancia de Snail2 en el ciclo del pelo mediante la utilización del ratón mutante nulo de *Snail2* (*Snail2*^{-/-}) indicó que su ausencia modifica el ciclo del FP a nivel de la telogén refractaria. Por último, datos previos del laboratorio mostraron que los ratones *Snail2*^{-/-} presentaban una mayor progresión tumoral con un alto componente inflamatorio en respuesta a la carcinogénesis química en piel. En el presente trabajo, mostramos que la dosis génica de *Snail2* es importante en la respuesta a la carcinogénesis de piel, y que es, fundamentalmente, la ausencia de *Snail2* en la población de células del sistema inmune conocidas como precursores mieloides, la causante de la progresión de las lesiones en ratones *Snail2*^{-/-}.

Snail1 and Snail2 are zinc finger transcription factors that belong to the Snail superfamily, and are characterized by their ability to induce epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), linked to embryonic development and pathological conditions like tumoral progression. One key event in EMT is the loss of E-cadherin, that occurs mainly by transcriptional repression through the recognition of specific-sequence regions, called E-boxes, by transcription factors, like Snail1 and Snail2. Both factors present a conserved N-terminal SNAG domain; a central region that differs between them, Snail1 presents nuclear export signals (NES) and a destruction box (DB), whereas Snail2 possesses a SLUG domain and a degenerated CtBP interaction domain (CID); and a DNA binding domain (DBD), formed by four and five zinc fingers (ZFs) in Snail1 and Snail2, respectively. Previous genetic expression profile analyses showed that Snail1 and Snail2 induce common and specific subsets of genes, but little is known about the reasons for such differences.

The present thesis describes the contribution of the Snail1 and Snail2 ZFs to their repressor and EMT induction ability, the relevance of Snail2 SNAG and SLUG domains, and the specific role of Snail2 in skin carcinogenesis and hair follicle (HF) cycle. The Snail1 and Snail2 ZFs analyses revealed that the ZFs required for their function are different for each factor; ZF1 and ZF2 of Snail1, and ZF3 or ZF4 of Snail2 are needed for *E-cadherin* repression and EMT induction. Moreover, we describe that Snail2 SNAG domain is essential for EMT induction, and show that serine 4 phosphorylation, located in this domain, is a key event for this process. On the other hand, SLUG domain impairs the Snail2 ability to induce EMT.

The analyses of HF cycle in *Snail2* knock out mice (*Snail2*^{-/-}) showed that *Snail2* modifies the response in refractory telogen. Finally, previous data from our lab described that *Snail2*^{-/-} mice showed an increase in tumoral progression in response to the mice skin chemical carcinogenesis. In the present work, the obtained data point that *Snail2* gene dosage is a key factor in the response to skin carcinogenesis, and that the *Snail2* absence in hematopoietic precursors, and in particular in myeloid progenitors, triggers the tumoral progression observed in *Snail2*^{-/-} mice.

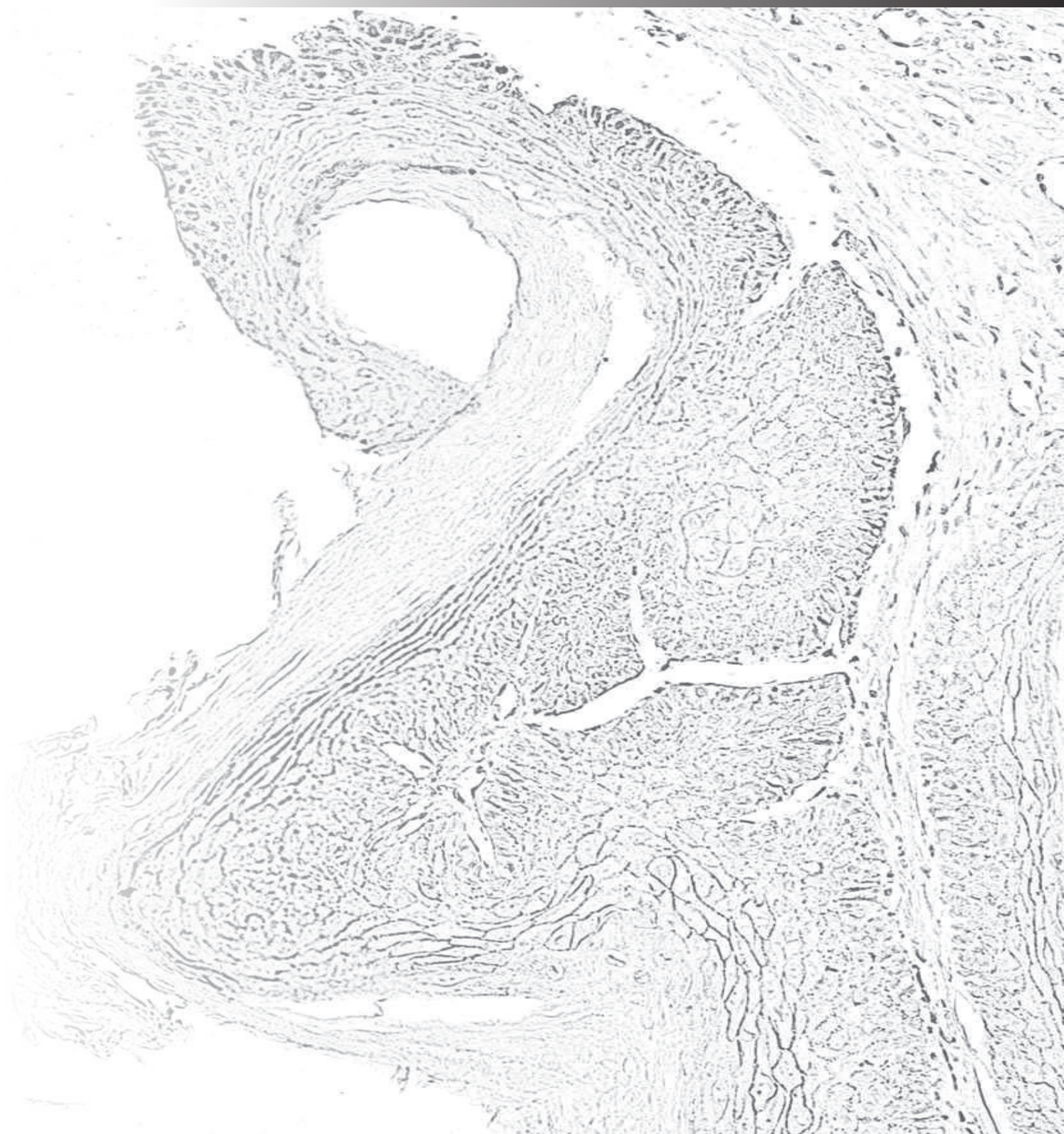


ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. Metástasis y plasticidad celular	9
1.1. El proceso de TEM	9
1.2. Cadherina-E: descripción de la familia, relevancia en homeostasis epitelial y en los procesos de TEM/MET	10
2. Regulación de la expresión de <i>cadherina-E</i>	12
2.1. Promotor de <i>cadherina-E</i> : elementos represores	12
2.2. Identificación de represores de la <i>cadherina-E</i> : Snail1/Snail2	13
3. La familia Snail	14
3.1. Características generales de la familia: factores de dedos de zinc	14
3.2. Expresión de Snail1 y Snail2 en desarrollo embrionario y tejidos adultos de ratón	14
3.3. Dominios funcionales de los factores Snail	15
3.4. Características de los dedos de zinc: conceptos generales y específicos de los factores Snail	17
3.5. Complejos de represión reclutados por los factores Snail	19
3.6. Mecanismos de regulación de los factores de la familia Snail	19
4. Homeostasis y carcinogénesis de piel	20
4.1. La piel: organización funcional y marcadores	20
4.2. Estructuras anejas de la piel: el folículo piloso	22
4.3. Ciclo de regeneración del folículo piloso: vías de regulación	22
4.4. Carcinogénesis química en piel de ratón	24
4.5. Inflamación y progresión tumoral	24
5. Los factores Snail en la homeostasis y carcinogénesis de piel.....	25
5.1. Snail1: estudios con ratones transgénicos	25
5.2. Snail2: estudios con ratones transgénicos	25
5.2.1. Características del ratón <i>Snail2</i> ^{-/-}	25
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Modelado computacional.....	35
2. Construcciones de DNA	35
3. Anticuerpos.....	37

4. Cultivos celulares.....	39
5. Transfecciones transitorias.....	39
6. Transfecciones estables	41
7. Ensayos de actividad promotora	42
8. Genotipado de <i>Snail2</i> en los modelos de ratón	42
9. Ensayo de crecimiento del folículo piloso.....	43
10. Carcinogénesis química en piel de ratón.....	43
11. Trasplante de médula ósea.....	43
12. Procesamiento de las muestras tisulares obtenidas en las necropsias	44
12.1. Inclusión en bloques de OCT	44
12.2. Inclusión en bloques de parafina	44
12.3. Análisis de las poblaciones hematopoyéticas mediante citometría de flujo	44
13. Tinción con Hematoxilina/Eosina (H&E)	45
14. Inmunodetección de marcadores en muestras tisulares	45
14.1. Inmunohistoquímica	45
14.2. Inmunofluorescencia	45
15. Detección de células apoptóticas en secciones de tejido.....	46
16. PCR cuantitativa a tiempo real.....	46
17. Análisis de proteínas.....	46
17.1. Inmunodetección de marcadores en células mediante inmunofluorescencia	46
17.2. Electroforesis e inmunotransferencia (Western blot)	48
17.3. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina	48
RESULTADOS	51
Parte 1. Caracterización del papel de <i>Snail2</i> en el ciclo del pelo y carcinogénesis química de piel de ratón	52
1.1. Función de <i>Snail2</i> en el folículo piloso.....	52
1.1.1. Efecto de la delección constitutiva de <i>Snail2</i> sobre el ciclo del folículo piloso	52
1.1.2. Alteraciones moleculares en ausencia de <i>Snail2</i> en la telogén refractaria	56
1.2. Respuesta a la carcinogénesis química de piel en función de la presencia y dosis génica de <i>Snail2</i>	58

1.2.1. Análisis molecular de las lesiones generadas en carcinogénesis química	59
1.3. Análisis del componente inflamatorio en la carcinogénesis química de piel de ratón.....	63
1.3.1. Inflamación y carcinogénesis en el modelo de ratón nulo de <i>Snail2</i>	63
1.3.2. Influencia de la ausencia de <i>Snail2</i> en el componente hematopoyético en el contexto de la carcinogénesis química	65
1.3.3. Influencia de la ausencia de <i>Snail2</i> en la acumulación del componente inflamatorio en la carcinogénesis química de piel	71
1.3.4. Alteraciones moleculares de las lesiones originadas en la carcinogénesis química	72
Parte 2. Caracterización funcional de los dominios de unión a DNA de Snail1 y Snail2, y de los dominios SNAG y SLUG de Snail2	75
2.1. Análisis <i>in silico</i> de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2.....	75
2.1.1. Identificación de los residuos implicados en el contacto con las bases del DNA	75
2.1.2. Identificación de los residuos aminoacídicos implicados en la interacción con los grupos fosfato de la hebra mayor del DNA e importancia de los conectores	77
2.1.3. Modelo de unión a cajas-E de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2	79
2.2. Caracterización funcional de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2.....	82
2.2.1. Actividad represora y afinidad por promotores diana de los mutantes en los dedos de zinc de Snail1	82
2.2.2. Actividad represora y afinidad por promotores diana de los mutantes en los dedos de zinc de Snail2	86
2.3. Contribución de la organización de las cajas-E en los promotores de <i>cadherina-E</i> a la represión mediada por Snail1 y Snail2	89
2.4. Contribución de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2 al proceso de TEM	91
2.5. Contribución de los dominios SNAG y SLUG de Snail2 al proceso de TEM.....	94
2.6. Relevancia de la fosforilación de la serina 4 de Snail2 al proceso de TEM.....	96
DISCUSIÓN	99
1. Caracterización del papel de Snail2 en la homeostasis de la piel de ratón: regulación del folículo piloso y respuesta a la carcinogénesis química	101
1.1. Contribución de Snail2 en el ciclo del folículo piloso.....	101
1.2. Snail2 como protector frente al desarrollo de lesiones inducidas por DMBA/TPA.....	103
1.3. Snail2 participa en la movilización de precursores hematopoyéticos: papel pro-tumoral del componente inflamatorio.....	105

1.4. Perspectiva global de la actuación de Snail2 en la homeostasis epidérmica y hematopoyética	107
2. Caracterización funcional de los dominios de unión a DNA de Snail1 y Snail2, y de los dominios SNAG y SLUG de Snail2	110
2.1. Divergencias entre Snail1 y Snail2: contribución diferencial de dedos de zinc equivalentes	110
2.2. Relevancia de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2 <i>in vivo</i> : capacidad de inducir TEM.....	113
2.3. Contribución de los dominios SNAG y SLUG de Snail2 a su capacidad de inducir TEM	114
2.4. Relevancia de la fosforilación de la serina 4 de Snail2 en su capacidad de inducir TEM.....	115
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXO I: PUBLICACIONES	149



7-AAD: 7-amino-actinomicina D.

Aldh1a3: aldehído deshidrogenasa 1a3 (*Aldehyde Dehydrogenase 1a3*).

BCA: ensayo del ácido bicinconínico (*Bicinchoninic Acid Assay*).

BCC: carcinoma de células basales (*Basal Cell Carcinoma*).

bHLH: motivo básico Hélice-Lazo-Hélice (*basic Helix-Loop-Helix*).

BLAST: herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos (*Basic Local Alignment Search Tool*).

BMPs: proteínas morfogenéticas de hueso (*Bone Morphogenetic Proteins*).

BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*).

cdc6: ciclo de división celular 6 (*cell cycle division 6*).

CDH1: gen que codifica para cadherina-E humana.

Cdh1: gen que codifica para cadherina-E de ratón.

CID: dominio de interacción con CtBP (*CtBP Interaction Domain*).

ChIP: ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.

CHX: cicloheximida.

CK2: caseína quinasa 2 (*Casein Kinase 2*).

CMV: citomegalovirus.

CtBP: proteína de unión al extremo carboxilo-terminal (*C-terminal Binding Proteins*).

CK: citoqueratina (*Citokeratin*).

DB: secuencia de destrucción (*Destruction Box*).

DBD: dominio de unión a DNA (*DNA Binding Domain*).

DC: dominio tipo cadherina (*Cadherin Domain*).

DKO: doble knock-out.

DMA: dimetiladipidimato.

DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno.

DMEM: medio esencial modificado de Dulbecco (*Dulbecco's Modified Essential Medium*).

DNA: ácido desoxi-ribonucleico (*Deoxy-Ribonucleic Acid*).

ECL: quimioluminiscencia aumentada (*Enhanced chemiluminescence*).

EDTA: ácido etilen-diaminotetracético.

EGF: factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*).

EIF: epidermis interfolicular.

ESE: potenciador específico de tejido (*Epithelial Specific Enhancer*).

FBLX 5/14: proteína F-box rica en repeticiones de leucina 14 (*F-box and leucine-rich repeat protein 5/14*).

FGF: factor de crecimiento fibroblástico (*Fibroblast Growth Factor*).

FoxC2: factor de transcripción Forkhead box C2 (*Forkhead box C2*).

FP: folículo piloso.

Frzb1: proteína 3 relacionada con Frizzled secretada (*Secreted Frizzled Related Protein 3*).

Gfi-1: factor de independencia del crecimiento 1 (*Growth factor independent*).

GSK3-β: Glucógeno sintetasa quinasa 3-β (*Glycogen Synthase Kinase 3-β*).

HA: hemaglutinina.

HDAC: histona deacetilasa (*Histone deacetylase*).

HEK293T: línea celular “*Human Embryonic Kidney*” 293 transformadas.

HNSCC: carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*).

HRP: peroxidasa de rábano (*Horseradish Peroxidase*).

IHC: inmunohistocitoquímica.

IMC: célula mieloide inmadura (*Immature Myeloid Cell*).

IRS: vaina radicular interna (*Inner Root Sheath*).

KLF8: factor *kruppel-like 8*

LacZ: gen que codifica para el enzima β-galactosidasa.

LSD1: demetilasa 1 específica de lisinas de histonas (*Lisine Specific Demethylase 1*).

LOXL2: proteína similar a lisil oxidasa tipo 2 (*Lysil Oxidase-like 2*).

LOXL3: proteína similar a lisil oxidasa tipo 3 (*Lysil Oxidase-like 3*).

LRC: “label-retaining cells” (células que retienen durante largos periodos 5-bromo 2-deoxiuridina).

MDCK-II: línea celular “*Madin Darby Canine Kidney*”.

Mdm2: *Murine doble minute 2*.

MDSCs: células supresoras derivadas del linaje mieloide (*Myeloid Derived Supresor Cells*).

MO: médula ósea.

NCoR: co-represor de receptores nucleares (*Nuclear Receptor Co-represor*).

NES: secuencia de exportación nuclear (*Nuclear Export Signal*).

NMuMG: línea celular “*Normal Murine Mammary Gland*”.

NOSi: óxido nítrico sintasa inducible (*inducible Nitric Oxide Synthase*).

Nt: N-terminal.

OCT: temperatura óptima de corte (*Optimal Cutting Temperature*).

ORS: vaina radicular externa (*Outer Root Sheath*).

PAK: quinasa activada por p21 (*p21 Activated Kinase*).

PBS: tampón salino fosfato (*Phosphate Buffer Saline*).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PDB: *Protein Data Bank*.

PFA: paraformaldehído (*Paraformaldehyde*).

PKA: proteína quinasa dependiente de c-AMP (*Protein Kinase AMPc dependent*).

PKD1: proteína quinasa D1 (*Protein Kinase D1*).

PMSF: fenil-metil-sulfonil fluoruro.

p.n.: post-natal.

Postn: periostina (*Periostin, osteoblast specific factor*).

Ppa: proteína con caja-F componente de la ligasa de ubiquitina E3.

p.r.: post-rasurado.

PRMT5: proteína arginina metil transferasa 5 (*Protein Arginine Methyl Transferase 5*).

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*quantitative Polimerase Chain Reaction*).

RLU: unidades relativas de luciferasa (*Relative Luciferase Units*).

RNA: ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*).

rpm: revoluciones por minuto.

SCC: carcinoma de células escamosas (*Squamous Cell Carcinoma*).

SCF: factor de células madre (*Stem Cell Factor*).

SDS: dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecil Sulphate*).

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (*SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*).

Smad: factor de transcripción homólogo a las proteínas MAD de *Drosophila melanogaster* y SMA de *Caenorhabditis elegans* (*SMA and MAD homologous transcription factor*).

SNAG: dominio común a Snail y Gfi-1 (*Snail and Gfi common domain*).

SLUG: dominio específico de la subfamilia Snail2.

SPR: región rica en serinas y prolina (*Serine and Proline rich Region*).

SpCC: carcinoma de células fusiformes (*Spindle Cell Carcinoma*).

TA: célula progenitora transitoria (*Transit Amplifying Cell*).

t.a.: temperatura ambiente.

TAM: macrófagos asociados a tumor (*Tumor Associated Macrophages*).

TBS: tampón salino de Tris (*Tris-Buffered Saline*).

TEM: transición epitelio-mesénquima.

TEM-TF: factor de transcripción inductor de transición mesénquima-epitelio.

TGF- β : factor de crecimiento transformante- β (*Transforming Growth Factor- β*).

TME: transición mesénquima-epitelio.

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α (*Tumor Necrosis Factor- α*).

TPA: promotor tumoral éster de forbol, 12-O-tetra-decanoilforbol-13-acetato.

UV: ultravioleta (*Ultraviolet*).

UVR: radiación ultravioleta (*Ultraviolet Radiation*).

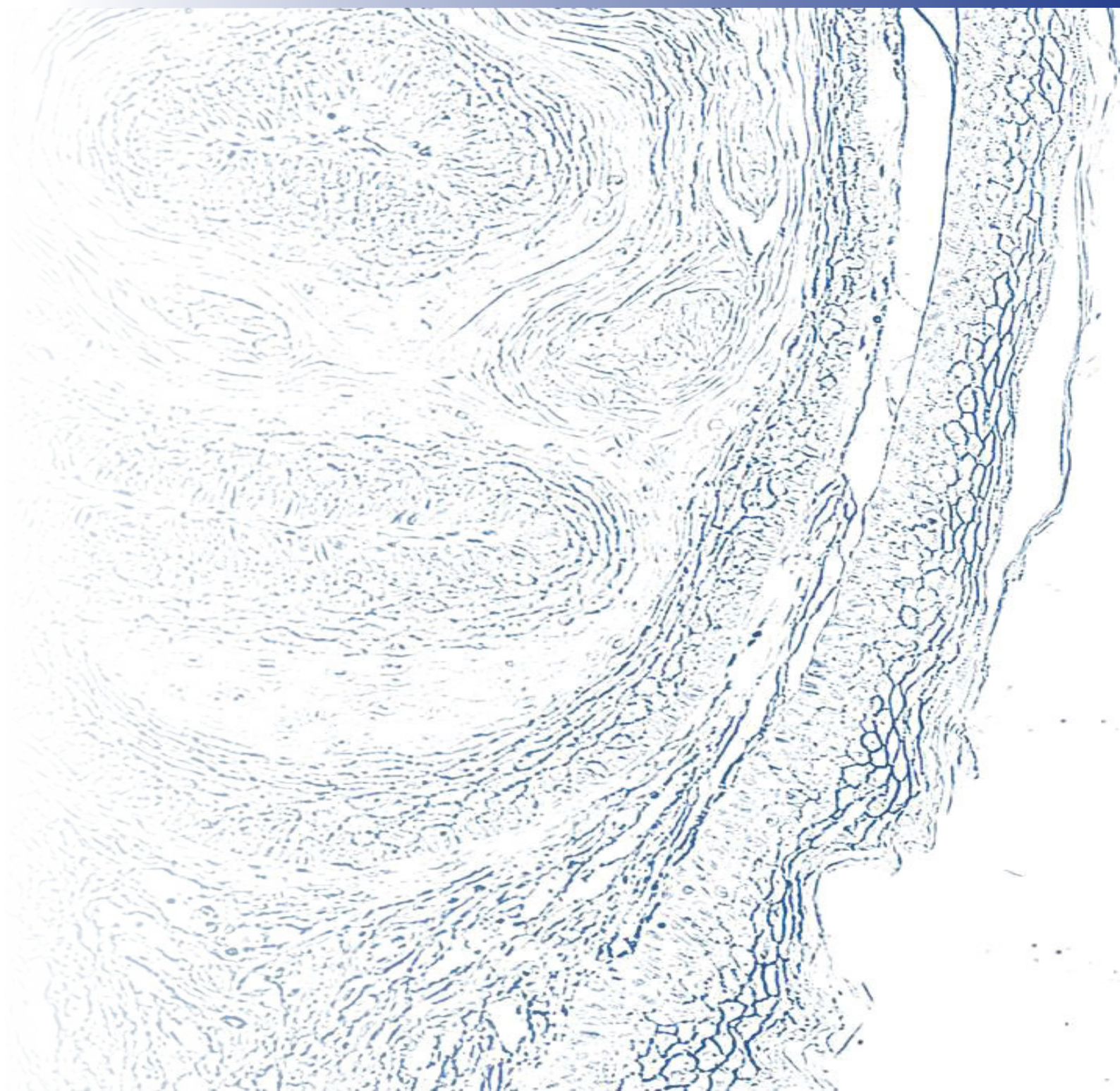
Wnt: proteína de señalización homóloga a las proteínas Wingless e Int de *Drosophila*.

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

YB-1: proteína 1 de unión a cajas-Y (*Y-box Binding Protein 1*).

ZEB: factores de transcripción de dedos de zinc y unión a cajas-E (*Zinc finger E-box binding homeobox*).

ZF: dedo de zinc (*Zinc Finger*).



1. Metástasis y plasticidad celular.

La formación de metástasis en los tumores sólidos es un proceso complejo y multise-cuencial que implica varias etapas: invasión de los tejidos adyacentes por las células tumorales, seguido de su intravasación y diseminación linfática o hematógena, extravasación a distancia, y establecimiento y supervivencia de focos tumorales en órganos distantes del tumor primario (Valastyan and Weinberg, 2011). En los tumores de origen epitelial (carcinomas), que representan más del 90% de los tumores humanos, la invasión local implica, a su vez, varias etapas: las células tumorales tienen que desprenderse del tumor primario, proteolizar la lámina basal que separa los tejidos epiteliales de los tejidos adyacentes y adquirir capacidad migratoria (Condeelis and Segall, 2003). Durante la invasión local de los carcinomas ocurren frecuentemente cambios en el fenotipo de la célula tumoral, conocidos como transición epitelio-mesénquima (TEM). Actualmente se considera que la TEM es uno de los procesos claves para la generación de la metástasis (Thiery et al., 2009).

1.1. El proceso de TEM.

La TEM es un proceso que ocurre de forma fisiológica en etapas del desarrollo embrionario temprano, como en la gastrulación o la migración de las células de la cresta neural (Thiery et al., 2009). Los procesos de TEM implican la pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de un fenotipo mesenquimal, lo que supone cambios drásticos en el patrón de expresión génica, asociados a la represión de genes de tipo epitelial y a la activación de genes relacionados con el fenotipo mesenquimático, invasivo y migratorio.

En un epitelio normal, las células se encuentran unidas entre sí y a la lámina basal gracias a la presencia de diferentes tipos de estructuras de adhesión que a su vez contribuyen a la polarización ápico-basal típica de las células epiteliales (Figura 1). Entre las uniones intercelulares destacan las uniones adherentes y desmosomales (mediadas por diferentes miembros de la familia de cadherinas), y las uniones estrechas que establecen la barrera de permeabilidad entre la membrana lateral y apical de las células epiteliales. Durante el proceso de TEM, la pérdida de expresión de marcadores epiteliales se acompaña de la adquisición de marcadores mesenquimáticos, de cambios en la estructura del citoesqueleto (por ejemplo aumentan los niveles de vimentina y se reorganiza el citoesqueleto de actina) y de la expresión de proteasas de matriz extracelular. En conjunto, estos cambios favorecen la adquisición de propiedades móviles e invasivas, a la vez que se modifica la polaridad celular hacia una orientación antero-posterior típica de células mesenquimáticas (Figura 1).

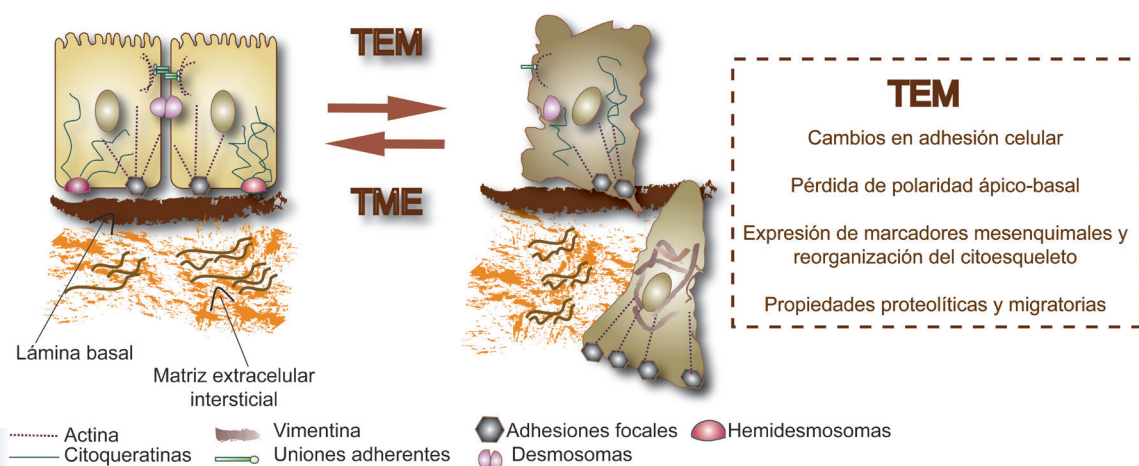


Figura 1. Representación esquemática de la TEM. Células epiteliales con las uniones típicas entre sí y a la lámina basal sufren una serie de cambios que originan la pérdida de estos contactos y se transforman en células fusiformes similares a las mesenquimáticas. Además, la TEM es un proceso reversible, dando lugar a la TME, en la que las células de características mesenquimales son capaces de adquirir un fenotipo epitelial.

Uno de los eventos clave de la TEM es la pérdida de expresión de cadherina-E, una proteína esencial para las uniones adherentes y para el mantenimiento de la arquitectura y homeostasis tisular (Takeichi, 1991; Peinado et al., 2004a). Otra característica de la TEM es su reversibilidad, ya que bajo determinadas condiciones, se puede inducir el proceso reverso de transición mesénquima-epitelio (TME) (Figura 1), que también es clave para la embriogénesis y el establecimiento de macrometástasis, y que involucra la recuperación de la expresión de cadherina-E y otras proteínas epiteliales y la pérdida de marcadores mesenquimales (Thiery, 2002; Shook and Keller, 2003; Peinado et al., 2007; Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009; Ocaña et al., 2012; Tsai et al., 2012).

1.2. Cadherina-E: descripción de la familia, relevancia en homeostasis epitelial y en los procesos de TEM/TME.

Las cadherinas constituyen una superfamilia de receptores de adhesión célula-célula dependientes de calcio implicadas mayoritariamente en interacciones célula-célula de tipo homofílico (entre moléculas de la misma familia) (Takeichi et al., 1988; Takeichi, 1990; Gumbiner and Yamada, 1995). La mayoría de cadherinas son proteínas con un dominio extracelular con varias repeticiones de un motivo denominado “dominio cadherina” (DC), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático corto por el que se asocian a proteínas citoplasmáticas (Takeichi, 1990; Yap et al., 1997) que actúan de nexo con el citoesqueleto celular (Figura 2). Se han identificado más de 80 miembros de la superfamilia de las cadherinas en vertebrados e invertebrados, que se han subdividido en cinco subfamilias en función de su estructura y/o organización funcional, entre las que se encuentran la subfamilia de cadherinas tipo I o clásicas y la de cadherinas desmosomales

(Nollet et al., 2000; Peinado et al., 2004a; van Roy, 2014). La cadherina-E pertenece a la subfamilia de las cadherinas tipo-I o clásicas, siendo el miembro fundador de la familia y el receptor mayoritario en las uniones adherentes de los tejidos epiteliales, donde forma interacciones homotípicas dependientes de calcio con moléculas de cadherina-E de células adyacentes (Takeichi et al., 1988; Takeichi, 1990) (Figura 2). Los estudios pioneros de M. Takeichi pusieron de manifiesto la relevancia de la cadherina-E para el establecimiento de los epitelios en las etapas iniciales del desarrollo embrionario (Takeichi, 1991), lo que se confirmó con el desarrollo de ratones *knockout* de *cadherina-E* (*Cdh1*), que mostraron letalidad embrionaria en la fase de pre-implantación con defectos en la compactación de la mórula (Larue et al., 1994; Riethmacher et al., 1995). La expresión de cadherina-E es, asimismo, requerida para el mantenimiento de la homeostasis epitelial de los tejidos adultos, mientras que se pierde en los procesos morfogenéticos que implican eventos de TEM (Peinado et al., 2004a).

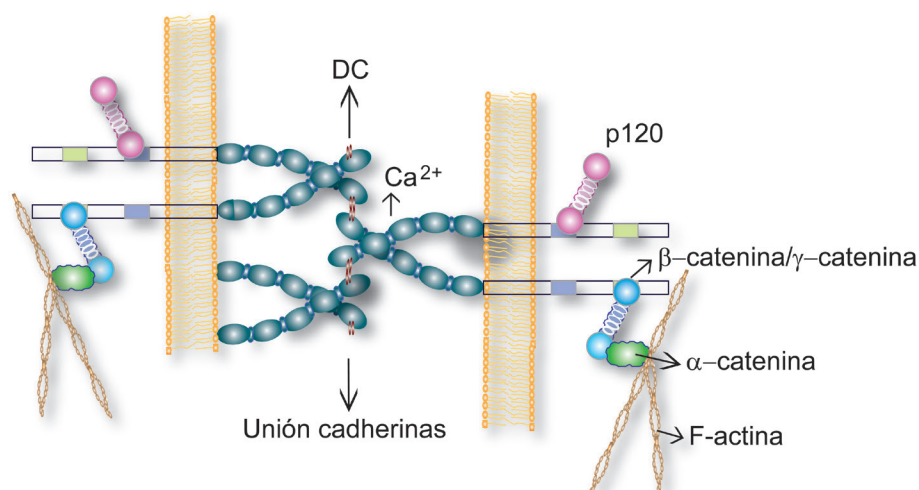


Figura 2. Diagrama esquemático de los dominios e interacciones de la cadherina-E en las uniones adherentes. El esquema muestra la organización estructural de cadherina-E en la región extracelular (formado por 5 dominios DC o dominios cadherina) e interacciones homotípicas dependientes de calcio, así como el dominio transmembrana e intracelular, que es capaz de interactuar con proteínas como β- ó γ-catenina que a su vez establecen uniones con el citoesqueleto celular a través de α-catenina. p120 interactúa con el dominio citoplásmico de forma independiente.

Durante la progresión de los carcinomas ocurre frecuentemente la pérdida de expresión o función de la cadherina-E, asociado a regiones invasivas y a procesos de TEM (Cano et al., 1996; Christofori and Semb, 1999; Thiery, 2002; Peinado et al., 2004b; Thiery and Sleeman, 2006). No obstante, la pérdida de cadherina-E puede ser reversible durante la progresión tumoral, y así los tumores secundarios pueden re-expresarla (Palacios et al., 1995; Caulin et al., 1996; Bukholm et al., 2000), asociada a procesos de TME (Thiery, 2002; Polyak and Weinberg, 2009; Ocaña et al., 2012; Tsai et al., 2012). Estas observaciones indican la necesidad de una ajustada regulación

espacio-temporal de la expresión de cadherina-E durante el desarrollo embrionario, y que se puede alterar durante la progresión tumoral.

2. Regulación de la expresión de *cadherina-E*.

El gen de *cadherina-E* está formado por 16 exones en el genoma (Sorkin et al., 1988), localizándose en el cromosoma 16 humano (*CDH1*), y en el cromosoma 8 murino (*Cdh1*) (Eistetter et al., 1988; Mansouri et al., 1988). La pérdida de expresión de cadherina-E durante la progresión tumoral puede deberse a diferentes mecanismos de regulación a nivel génico, post-transcripcional y/o post-translacional. Dentro de los mecanismos de regulación génica se han descrito:

- 1) Mutaciones génicas, detectadas exclusivamente en algunos tipos de tumores como carcinomas gástricos difusos, carcinomas lobulillares de mama y sarcomas sinoviales (Berx et al., 1995; Guilford et al., 1998; Strathdee, 2002).
- 2) Regulación epigenética, que provoca el silenciamiento del gen de *cadherina-E* mediante la metilación de islas CpG de su promotor (Graff et al., 2000; Grady et al., 2000; Cheng et al., 2001; Strathdee, 2002; Tamura, 2002; Sarrio et al., 2003).
- 3) Represión transcripcional, mediada por factores de transcripción que reprimen la expresión del gen de *cadherina-E* (Peinado et al., 2004a; Peinado et al., 2007; Thiery et al., 2009).

2.1. Promotor de *cadherina-E*: elementos represores.

En el promotor proximal del gen de *cadherina-E* murino se distinguen varios elementos de regulación: una región rica en GC (-40); una caja CAAT (-65); un elemento palindrómico, denominado E-pal (-70 a -90), constituido por dos cajas-E adyacentes (caja-E1 y caja-E2) (CAGGTG) flanqueadas por cuatro nucleótidos invertidos; y una tercera caja-E (caja-E3) (CACCTG) (-30) próxima al inicio de la transcripción (Behrens et al., 1991; Hennig et al., 1996) (Figura 3). La región rica en GC estimula la actividad del promotor, mientras que la caja CAAT colabora en el mantenimiento de la actividad basal (Behrens et al., 1991; Hennig et al., 1996; Faraldo et al., 1997). El elemento E-pal fue inicialmente descrito como un regulador positivo de tejido epitelial (Behrens et al., 1991), pero posteriormente se caracterizó como un regulador negativo en células deficientes en la expresión de cadherina-E (Hennig et al., 1996; Faraldo et al., 1997; Rodrigo et al., 1999). Otros elementos reguladores son la región CE, próxima al elemento E-pal (Rodrigo et al., 1999) (Figura 3), un potenciador específico de tejido epitelial (ESE) y una caja GT, ambos localizados en el primer intrón (Hennig et al., 1996; Wang et al., 2007). El estudio comparativo de los promotores de *cadherina-E* murino, humano y canino mostró que la caja CAAT, la región

rica en GC y las cajas-E1 y -E3 se encuentran conservadas en la misma posición, mientras que la caja-E2 sólo está presente en el promotor murino (Hennig et al., 1996; Girolodi et al., 1997; Comijn et al., 2001); por su parte, los promotores humano y canino poseen una caja-E4 adicional situada detrás del inicio de la transcripción (+22) (Batlle et al., 2000; Peinado et al., 2004a) (Figura 3).

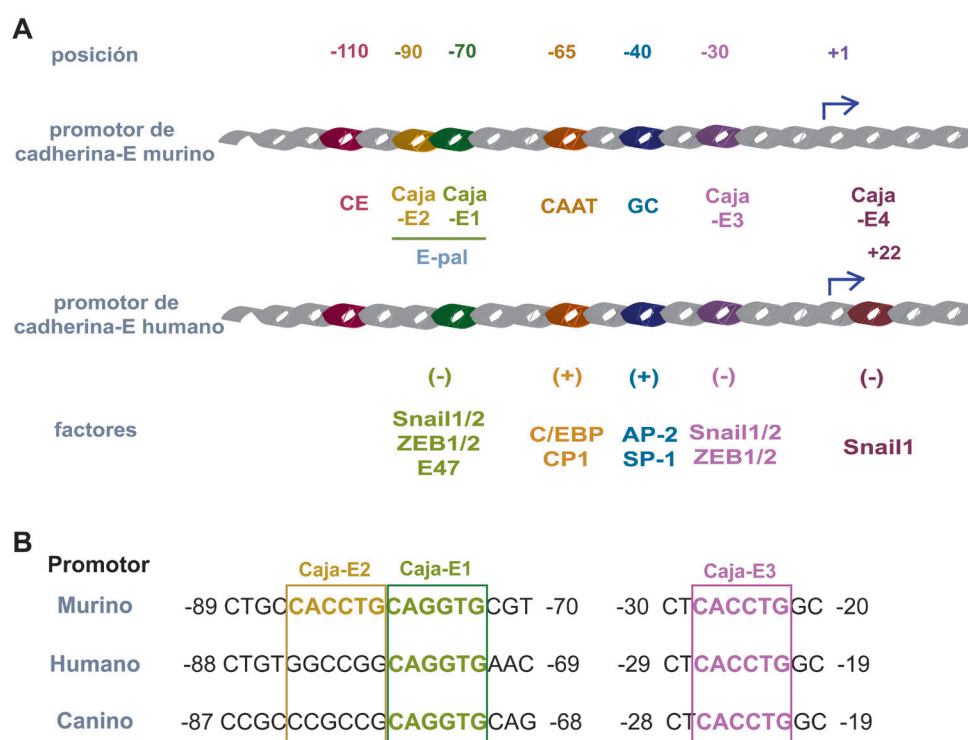


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del promotor de *cadherina-E*. (A) Comparación entre los distintos elementos reguladores del promotor murino y humano de *cadherina-E*, incluyendo los factores que interaccionan con cada uno de ellos. Los símbolos (+) y (-) indican elementos activadores y represores, respectivamente. (B) Comparación de la organización de cajas-E1 a -E3 entre los promotores murino, humano y canino. Las secuencias recuadradas indican las cajas-E conservadas.

2.2. Identificación de represores de la *cadherina-E*: Snail1/Snail2.

Desde el año 2000 se han identificado varios factores de transcripción que reprimen la actividad del promotor de *cadherina-E*. Entre ellos, cabe destacar los miembros de las familias Snail (Snail1 y Snail2) (Cano et al., 2000; Batlle et al., 2000; Hajra et al., 2002; Bolos et al., 2003), ZEB (ZEB-1, y ZEB-2) (Grooteclaes and Frisch, 2000; Comijn et al., 2001; Eger et al., 2005; Vandewalle et al., 2009), y bHLH, (E47, E2-2 y Twist1) (Perez-Moreno et al., 2001; Yang et al., 2004; Sobrado et al., 2009). Adicionalmente, se han descrito otros represores como FoxC2, Goosecoid, KLF8 y cdc6 (Hartwell et al., 2006; Mani et al., 2007; Wang et al., 2007; Sideridou et al., 2011). Algunos

de estos factores, como Snail1, Snail2, ZEB1/ZEB2, E47 y cdc6 se unen directamente al promotor de *cadherina-E* mediante su interacción con el elemento E-pal o las tres cajas-E del promotor humano o canino (Batlle et al., 2000; Comijn et al., 2001; Bolos et al., 2003; Eger et al., 2005; Cubillo et al., 2013), mientras que KLF8 interacciona con la caja GT del primer intrón, y otros factores como E2-2, Twist1, Goosecoid o FoxC2 reprimen la expresión de *cadherina-E* a través de mecanismos indirectos (Thiery et al., 2009; Sobrado et al., 2009; Casas et al., 2011). La mayoría de los represores de *cadherina-E* actúan a su vez como inductores de TEM, siendo conocidos actualmente como TEM-TFs (Factores de transcripción que inducen TEM) (Nieto and Cano, 2012).

A pesar de la aparente similitud de acción entre los factores TEM-TFs mencionados, trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que la TEM inducida por la expresión estable de Snail1, Snail2, E47 o E2-2 en células epiteliales está asociada con la activación de programas genéticos comunes y específicos de cada factor, sugiriendo un papel diferencial para estos TEM-TFs en la progresión e invasión tumoral (Moreno-Bueno et al., 2006; Sobrado et al., 2009).

3. La familia Snail.

3.1. Características generales de la familia: factores de dedos de zinc.

Snail1 y Snail2 pertenecen a la superfamilia de factores Snail (Hemavathy et al., 2000a; Nieto, 2002), que se subdivide en las familias Snail y Scratch, presentando la familia Snail tres miembros: Snail1, Snail2 y Snail3 (Manzanares et al., 2001; Manzanares et al., 2004; Barrallo-Gimeno and Nieto, 2009). Estos factores se caracterizan por ser represores transcripcionales con motivos de dedos de zinc C_2H_2 capaces de reconocer secuencias de tipo cajas-E en los promotores de sus genes diana (Fuse et al., 1994).

Prácticamente la totalidad de los vertebrados poseen una copia de Snail1 y Snail2. El gen Snail1 mapea en el cromosoma 2 murino (Chr 2-97.0)(Jiang et al., 1997) y en el cromosoma 20 humano (Chr 20q16.1)(Paznekas et al., 1999), mientras que el gen Snail2 se localiza en el cromosoma 16 murino (Chr 16-9.4)(Jiang et al., 1998a) y en el cromosoma 8 humano (Chr8q11) (Cohen et al., 1998). Ambos genes están compuestos de tres exones con una organización génica similar (Jiang et al., 1998a; Paznekas et al., 1999).

3.2. Expresión de Snail1 y Snail2 en desarrollo embrionario y tejidos adultos de ratón.

Como se ha mencionado anteriormente, Snail1 y Snail2 actúan como inductores de TEM, y como tales se pueden asociar a eventos en los que existe un cambio de fenotipo epitelial a mesenquimático, como ocurre durante el desarrollo embrionario y en algunos tejidos adultos en

ciertas situaciones fisiológicas y patológicas. No obstante, existen diferencias obvias entre ambos factores, que se hicieron evidentes cuando se analizaron modelos murinos mutantes nulos para uno u otro factor. El ratón mutante nulo de *Snail1* muestra letalidad embrionaria por defectos en la gastrulación (Carver et al., 2001). Por el contrario, el ratón mutante nulo de *Snail2* es viable y no presenta defectos en la gastrulación ni en el desarrollo de la cresta neural (Jiang et al., 1998b). Los estudios de expresión de *Snail1* y *Snail2* en embriones de ratón confirmaron que *Snail1* está estrechamente ligado a procesos de TEM, mientras que *Snail2* se expresa en el mesodermo y en regiones migratorias, pero no necesariamente relacionado con eventos de TEM (Sefton et al., 1998; Cano et al., 2000).

Recientemente se ha descrito el fenotipo de ratones nulos para *Snail3*, así como el ratón doble mutante nulo para *Snail2* y *Snail3* (*Snail2*^{-/-} *Snail3*^{-/-}; DKO) (Bradley et al., 2013; Pioli et al., 2013). Mientras que el mutante nulo de *Snail3* no presenta un fenotipo destacado (Bradley et al., 2013), el doble mutante para *Snail2* y *Snail3* presenta características similares a los ratones *Snail2*^{-/-} pero con algunos rasgos más exacerbados, como la presencia de un timo significativamente más pequeño y desestructurado, así como alteraciones en los folículos del bazo (Pioli et al., 2013).

En los tejidos adultos, *Snail1* y *Snail2* presentan una expresión diferencial, reforzando que ambos factores son funcionalmente independientes. Así, *Snail1* se expresa únicamente en pulmón y corazón, y a bajos niveles en cerebro, hígado y músculo esquelético (Paznekas et al., 1999). Sin embargo, la expresión de *Snail2* presenta una distribución más amplia, expresándose de forma elevada en las capas basales de epitelios estratificados o pseudoestratificados como la epidermis, mucosa oral, esófago y estómago (Parent et al., 2004; Savagner et al., 2005). Además, *Snail2* también se expresa en fibroblastos, células del músculo liso y en tejidos mesenquimáticos como cartílago, pulmón, glomérulos renales, útero y ovario (Inukai et al., 1999; Hemavathy et al., 2000a; Parent et al., 2004).

3.3. Dominios funcionales de los factores Snail.

Las proteínas de la familia Snail están organizadas en 3 dominios funcionales (Figura 4): un extremo N-terminal donde se encuentra el dominio de transactivación (SNAG), una región central rica en serinas y prolina (SRP), que difiere entre los factores *Snail1* y *Snail2*, y una región C-terminal altamente conservada donde se encuentra el sitio de unión a DNA (DBD) (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2009).

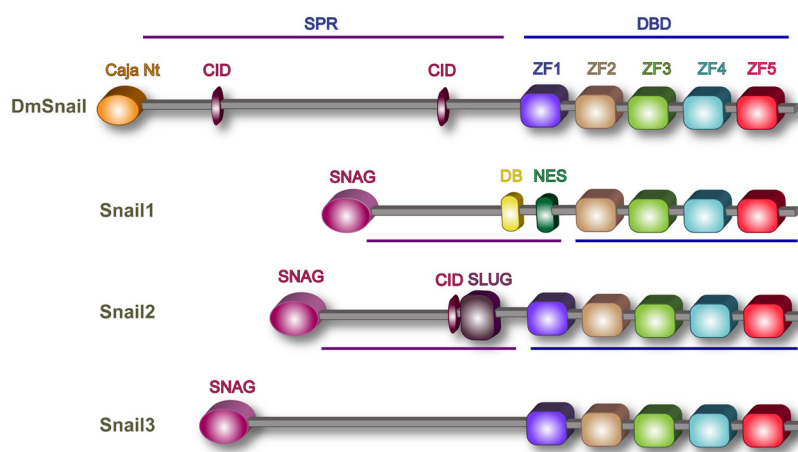


Figura 4. Representación esquemática de la organización funcional de los miembros de la familia Snail. El miembro fundador de la familia Snail (Dmsnail) no contiene el dominio SNAG, y presenta en su lugar una caja N-terminal (Nt). También es el único junto con Snail2 en poseer dominios de interacción con CtBP (CID). Todos los factores contienen una región central rica en serinas y prolinas (SPR), y un dominio de unión al DNA (DBD) formado por 4 o 5 dedos de zinc (ZFs) en vertebrados. La región SPR de Snail1 contiene una caja de destrucción (DB) y secuencias de exportación nuclear (NES), mientras que la de Snail2 presenta un dominio CID y un dominio SLUG.

El dominio de transactivación (SNAG) fue descrito inicialmente como motivo represor presente en proteínas de dedos de zinc como Snail y Gfi -de ahí su denominación (Grimes et al., 1996; Nakayama et al., 1998)- y confirmado posteriormente en el caso de miembros de la familia Snail (Batlle et al., 2000; Hemavathy et al., 2000b; Peinado et al., 2004b; Molina-Ortiz et al., 2012). Además, recientemente, se ha descrito la presencia de sitios de exportación nuclear en dicho dominio (Mingot et al., 2013). Su secuencia mínima en miembros de la familia Snail es de nueve aminoácidos (Nieto, 2002); y no se encuentra presente en el miembro fundador de la familia, *Drosophila melanogaster* Snail (Dmsnail), que posee en su lugar una caja Nt y dos dominios de interacción con proteínas de unión al C-terminal (CtBP: C-terminal binding proteins), denominados CID (CtBP interacting domain) (Hemavathy et al., 2004) (Figura 4). Ningún otro miembro de la familia Snail presenta este tipo de dominio, excepto Snail2, que presenta un sitio CID degenerado (Hemavathy et al., 2000b; Nieto, 2002; Cobaleda et al., 2007). Las regiones SPR de Snail1 y Snail2 presentan notables diferencias (Sefton et al., 1998): Snail2 contiene un dominio SLUG de 29 aminoácidos, requerido para su actividad represora (Molina-Ortiz et al., 2012), mientras que Snail1 tiene un dominio regulador que contiene señales de exportación nuclear (NES) (Dominguez et al., 2003) y una caja de destrucción (DB) (Zhou et al., 2004). El dominio DBD de los factores Snail consta de 4 a 6 dedos de zinc (ZFs) de tipo C_2H_2 capaces de reconocer secuencias consenso de tipo caja-E (CAGGTG) (Figura 4) (Grimes et al., 1996; Hemavathy et al., 2000b; Barrallo-Gimeno and Nieto, 2009). Además, incluidas en la secuencia de los ZFs existen

señales de localización nuclear (Yamasaki et al., 2005; Mingot et al., 2009).

3.4. Características de los dedos de zinc: conceptos generales y específicos de los factores Snail.

Los ZFs son dominios de aproximadamente 30 aminoácidos, con una estructura de 2 láminas- β y una α -hélice coordinadas con un átomo de zinc (Lee et al., 1989) (Figura 5A). Dentro de esta estructura existen una serie de aminoácidos clave para la unión al DNA y que son los residuos de contacto con las bases, mientras que el resto de residuos son importantes para la estabilidad del dominio. Los residuos esenciales de contacto se encuentran en las posiciones -1, +3 y +6 de la α -hélice, mientras que las posiciones +1 y +5 ejercen interacciones directas o hidrofílicas con los fosfatos del DNA (Pabo et al., 2001) (Figura 5B). De esta manera, dependiendo de los aminoácidos específicos de contacto y según el código de reconocimiento de bases (Figura 5C), cada ZF sería capaz de interactuar con un subsitio de 3 pares de bases diferente (Seeman et al., 1976; Christy et al., 1988). Los ZFs se clasifican como canónicos o no canónicos según el tipo de reconocimiento específico, y en donde el no canónico difiere en la interacción a través de las posiciones -1 y +2 de la α -hélice, respetando el modelo clásico de interacción en las posiciones +3 y +6 (Pabo et al., 2001). Las proteínas con ZFs son muy variadas en cuanto al número de ZFs que pueden presentar, pero ello no implica que todos los ZFs que forman parte de la secuencia de la proteína interactúen con el DNA. Además, los ZFs que sí interactúan con el DNA lo hacen en forma de dímeros, de forma que dos ZFs que se encuentran seguidos en la estructura de la proteína son capaces de interactuar cada uno de ellos con un subsitio de 3 pares de bases, reconociendo por lo tanto en total una secuencia de 6 pares de bases.

Los ZFs de tipo C_2H_2 tienen una secuencia consenso en la que las dos cisteínas y las dos histidinas sirven como ligando del zinc formando una unión tetraédrica, al igual que en ZFs de tipo C_4 , de forma que las dos cisteínas se separan por una vuelta de hélice en la lámina β -antiparalela y las dos histidinas se localizan en la porción C-terminal de la α -hélice (Miller et al., 1985; Brown et al., 1985). Por su parte, los residuos conservados de tirosina, fenilalanina y leucina forman un núcleo hidrofóbico (Figura 5A).

Además de la interacción directa con las bases, otros factores contribuyen a las características funcionales de los ZFs, como: el átomo de zinc, importante para el plegamiento y la actividad del dominio; los contactos con los fosfatos, esenciales para el reconocimiento ZF-DNA; los conectores entre dos dedos de zinc adyacentes; y la propia conformación del DNA (Pabo et al., 2001). Las interacciones con fosfatos favorecen el contacto con la hebra 5'→3' del DNA sobre

A

Diagram illustrating the structure of a protein (likely a zinc finger) with a consensus sequence ZF. The sequence is shown as: (Tyr, Phe)-X-Cys-X_{2,4}-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X_{3,5}-His-X_{2,6}. The structure shows a beta-sheet (blue) and an alpha-helix (pink). Residues are numbered -1, +3, +6. Specific residues are labeled: Cys, Hys, Cys, Hys. The sequence is mapped to the structure: 1ª lámina-β, 2ª lámina-β, and α-hélice.

B

Posiciones de los aminoácidos respecto a la α-hélice

Diagram illustrating the positions of amino acids relative to the α-helix. The sequence is shown as: lámina-β - [X - X - X - X - X - X₋₁ - X₁ - X₂ - X₃ - X - X₅ - X₆ - X₇ - XXX...] - α-hélice.

Posiciones clásicas de interacción con bases del DNA

Posiciones menos comunes de interacción con bases del DNA

Posiciones que interaccionan con fosfatos del DNA

C

CÓDIGO DE RECONOCIMIENTO DE BASES

Diagram illustrating the recognition code for bases. The structures shown are:

- Arg (Arginine): $\text{NH}_2-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
- Lys (Lysine): $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
- His (Histidine): $\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH}_2 \\ \diagdown \end{array} \text{C}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
- Asp (Aspartate): $\text{OH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
- Glu (Glutamate): $\text{OH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
- Timina (Thymine): $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
- Adenina (Adenine): $\text{NH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$

The diagram shows the recognition code for bases. The structures shown are: Arg (Arginine), Lys (Lysine), His (Histidine), Asp (Aspartate), Glu (Glutamate), Timina (Thymine), and Adenina. The structures are connected to the bases they recognize: Arg to Guanina, Lys to Guanina, His to Guanina, Asp to Citosina, Glu to Citosina, Timina to Adenina, and Adenina to Adenina. The structures are also labeled as Donadores/Aceptores mixtos de puentes de H⁺ (Gln, Asn).

Figura5. Características generales de los dedos de zinc. (A) Estructura y secuencia consenso de un ZF formado por dos láminas- β antiparalelas y una α -hélice. Las dos cisteínas e histidinas son las encargadas de formar la coordinación con el átomo de zinc. Se encuentran indicadas las posiciones, respecto a la α -hélice, de los residuos de interacción con bases del DNA (-1, +3 y +6). **(B)** Esquema de las posiciones clave para el reconocimiento de bases del DNA, así como las que interaccionan con fosfatos. **(C)** Código de reconocimiento de bases por parte de los aminoácidos que forman parte del ZF.

Los ZFs de tipo C₂H₂ de las proteínas Snail son repeticiones en tándem de 22-25 aminoácidos, conservando la organización estructural ββα de los motivos clásicos (Sefton et al., 1998; Barrallo-Gimeno and Nieto, 2009; Mingot et al., 2009). El dominio C-terminal de Snail1 y Snail2 difiere en el número de ZFs: cuatro (ZF1 a ZF4) en Snail1, y cinco (ZF1 a ZF5) en Snail2 en vertebrados, siendo equivalentes los dedos ZF2 a ZF5 de Snail2 a los ZF1 a ZF4 de Snail1

(Sefton et al., 1998; Nieto, 2002; Barrallo-Gimeno and Nieto, 2009). Estas diferencias podrían proporcionar diferentes interacciones o afinidad de unión por los genes diana. De hecho, nuestro grupo describió diferencias en la afinidad de Snail1 y Snail2 por el elemento E-pal *in vitro* de hasta 2 órdenes de magnitud (Bolos et al., 2003). Por otra parte, el DBD de los factores Snail se ha utilizado para clasificar a la superfamilia Snail: ZF3 y ZF4 tienen una secuencia consenso en todos los miembros de la familia, y ZF2 y ZF5 diferencian a la familia Snail y Scratch (Sefton et al., 1998; Manzanares et al., 2001; Nieto, 2002; Barrallo-Gimeno and Nieto, 2009). Por otra parte, se ha sugerido que el ZF1 de Snail2 y de Dmsnail no es funcional (Pavletich and Pabo, 1993; Sefton et al., 1998). No obstante y pese a la importancia de los ZFs en la estructura de Snail1 y Snail2, hasta la fecha no se ha estudiado en profundidad su comportamiento en ambos factores o si siguen las características generales de los ZFs.

3.5. Complejos de represión reclutados por los factores Snail.

Los miembros de la familia Snail requieren de co-represores para ejercer su actividad represora. Los co-represores interaccionan fundamentalmente a través del dominio SNAG. El primer co-represor descrito para esta familia fue CtBP (Shi et al., 2003). Snail1 es capaz de reclutar a mSin3A y las histonas deacetilasas 1 y 2 (HDAC1/2) para reprimir la expresión de *cadherina-E*, disminuyendo la acetilación de las histonas H3 y H4 y la metilación de la lisina 9 de la histona H3, lo que provoca la compactación de la cromatina (Peinado et al., 2004b). Otros co-represores de Snail1 son miembros del complejo Polycomb (Herranz et al., 2008), proteínas Lim de la familia Ajuba, la proteína arginina metil transferasa 5 (PRMT5) (Hou et al., 2008; Langer et al., 2008), y la demetilasa 1 específica de lisinas de histonas (LSD1) (Lin et al., 2010a; Lin et al., 2010b). En el caso de Snail2, se ha descrito su interacción con los co-represores NCoR y con CtBP a través de los dominios SNAG y SLUG, respectivamente (Molina-Ortiz et al., 2012); la interacción de Snail2 con CtBP y HDAC1 se ha descrito, a su vez, como necesaria para reprimir la expresión de *BRCA2* en líneas de carcinoma de mama (Tripathi et al., 2005).

3.6. Mecanismos de regulación de los factores de la familia Snail.

Los factores Snail se regulan por una gran variedad de vías de señalización y factores, entre los que cabe destacar TGF- β , EGF, FGF, BMP y Wnt a diferentes niveles (transcripcional, traduccional o post-traduccional) (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Peinado et al., 2007; De Craene and Berx, 2013). Entre los mecanismos de regulación post-traduccional, la fosforilación de Snail1 por GSK3 β y PKD1 actúan como reguladores negativos (Zhou et al., 2004; Yook et al., 2005; Du et al., 2010a), mientras que la fosforilación por PAK ("p21 activated kinase") y Lats2 favorece la

localización nuclear de Snail1 (Yang et al., 2005; Zhang et al., 2012). En nuestro grupo describimos la fosforilación *in vivo* de Snail1 en varios residuos de serina, caracterizando la fosforilación de la serina 11 y de la serina 92 por la casein-quinasa-2 (CK2) y la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), respectivamente, como esenciales para la actividad represora e inducción de TEM (MacPherson et al., 2010). Además, se ha descrito que la fosforilación de la serina 4 de Snail1 favorece su localización nuclear (Mingot et al., 2013). Recientemente, se ha descrito que la fosforilación en las serinas 100/104 y 92/96 por GSK3 β dirige a Snail2 a la degradación en el proteasoma (Kim et al., 2012), al igual que se había descrito anteriormente para Snail1 (Zhou et al., 2004; Yook et al., 2005).

Otro mecanismo de regulación post-traducciona de Snail1 está mediado por las lisil-oxidasas-like 2 y 3 (LOXL2/3) que protegen a Snail1 de la fosforilación por GSK3 β , aumentando así su estabilidad (Peinado et al., 2005). Asimismo, se han descrito reguladores traduccionales de Snail1 como el factor YB-1 (Evdokimova et al., 2009), o la estabilización de Snail1 y Snail2 por la proteína F-box Ppa (Vernon and LaBonne, 2006; Lander et al., 2011) y de Snail1 por FBXL14 y FBXL5 (Viñas-Castells et al., 2010; Viñas-Castells et al., 2014), así como la activación de la degradación de Snail2 por el proteasoma mediante la interacción con p53 y Mdm2 (Wang et al., 2009).

A nivel post-transcripcional, destaca la regulación de factores Snail por varios microRNAs (Lamouille et al., 2013; Diaz-Lopez et al., 2014), que desempeñan un papel esencial en los procesos de plasticidad celular.

4. Homeostasis y carcinogénesis de piel.

4.1. La piel: Organización funcional y marcadores.

La piel es la principal barrera fisiológica del organismo frente al entorno. Está formada por la hipodermis, compuesta de tejido adiposo; la dermis, donde se encuentra el tejido conectivo; y la epidermis, que es la parte más externa y está constituida por un epitelio estratificado (Fuchs, 1990).

La epidermis está formada por una capa basal de células proliferativas que dan lugar a una serie de capas suprabasales estratificadas en las que el grado de diferenciación celular aumenta hacia la superficie de la piel, donde las células son continuamente reemplazadas por células de los estratos internos (Fuchs and Horsley, 2008). Histológicamente, la epidermis se divide en 4 estratos denominados en el sentido desde el interior hacia la superficie como: basal, espinoso, granular y córneo (Figura 6).

La epidermis se separa de la dermis por la lámina basal, una forma especializada de matriz extracelular (constituida mayoritariamente por redes de colágeno IV y laminina), rica en factores de crecimiento que proporcionan estímulos proliferativos a las capas más internas de la epidermis. En la epidermis se encuentran una serie de estructuras anejas: folículos pilosos, glándulas sebáceas que lubrican la superficie de la piel a través de los canales pilosebáceos y glándulas sudoríparas (ausentes en ratón), originadas a partir de células madre específicas (Ito et al., 2005; Levy et al., 2005). De forma general la epidermis se divide en dos partes, los folículos pilosos (FPs) y la epidermis interfolicular (EIF).

La capa basal de la EIF contiene una población de progenitores que retiene el potencial proliferativo y la capacidad de diferenciación para originar las capas suprabasales (Blanpain and Fuchs, 2006; Fuchs and Horsley, 2008). Las células progenitoras de la capa basal pueden sufrir un proceso de división simétrica dando lugar a dos células progenitoras transitorias o “transit amplifying cell” (TA), o bien un proceso de división asimétrica originando una TA y una célula que entra en un programa de diferenciación terminal para dar lugar a las capas suprabasales (Jones and Watt, 1993; Ghazizadeh and Taichman, 2001). El programa de diferenciación epidérmica está regulado, entre otros, por las vías de Notch1 y Hedgehog, siendo la vía de Notch1 esencial para su correcta diferenciación (Lefort and Dotto, 2004; Nguyen et al., 2006; Watt et al., 2008). Las células del estrato espinoso y granular permanecen transcripcionalmente activas, mientras que las células del estrato córneo son metabólicamente inactivas y pierden los orgánulos citoplasmáticos, dando lugar a células fantasmas que constituyen la barrera epidérmica (Fuchs, 2007; Koster and Roop, 2007).

Las proteínas estructurales más abundantes de la epidermis son las citoqueratinas (CK), que forman heterodímeros de filamentos intermedios que conectan con los hemidesmosomas (unión de las células basales a la lámina basal) y desmosomas (uniones intercelulares de capas espinosa y granular). La capa basal se caracteriza por la expresión de CK5 y CK14, mientras que las capas suprabasales espinosa y granular expresan CK1 y CK10 (Fuchs and Green, 1980) (Figura 6). La expresión de cadherinas sigue un patrón específico en la epidermis: cadherina-P en la capa basal; cadherina-E en la capa basal y suprabasales; y cadherinas desmosomales en los estratos espinoso y granular. Por su parte, la capa granular expresa proteínas típicas de diferenciación terminal como involucrina y profilagrina, para finalmente en el estrato córneo predominar la filagrina y loricrina (Figura 6).

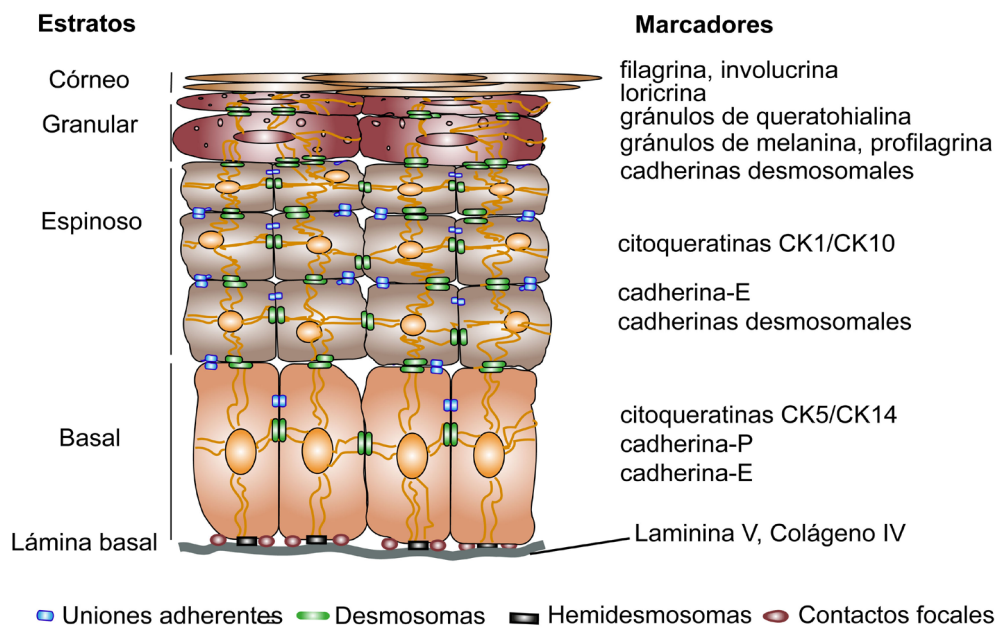


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de la epidermis. El esquema representa las diferentes capas y estratos que presenta la epidermis, tipos de uniones que se establecen entre las células, y marcadores característicos utilizados para diferenciar los diferentes estratos. En gris, en la parte inferior, se representa la lámina basal, que conecta las células de la capa basal con la dermis.

4.2. Estructuras anejas de la piel: el folículo piloso.

La morfogénesis del FP comienza con la invaginación de la epidermis en la dermis durante el desarrollo embrionario, siendo un proceso dependiente de las señales paracrinas entre células epidérmicas y de la dermis. En primer lugar se forma una estructura condensada denominada papila dermal, que dirige la posterior formación del FP, y está formada por células altamente proliferativas que conforman la matriz. Las células de la matriz generan la vaina radicular interna ("*Inner Root Sheath*" (IRS)) y el canal del pelo (Legue and Nicolas, 2005), siendo la IRS la que guía el canal del pelo hacia la superficie de la piel (Figura 7A). La capa de células más externa, vaina radicular externa ("*Outer Root Sheath*" (ORS)), está contigua a la epidermis y contiene la región conocida como "*bulge*" o región prominente, donde residen las células madre del FP.

4.3. Ciclo de regeneración del folículo piloso: vías de regulación.

Durante la vida del ratón se suceden diferentes ciclos de crecimiento-degeneración del FP (anagén, catagén y telogén), estando los primeros de ellos sincronizados. La primera telogén tiene lugar a los 20 días post-nacimiento (p.n.) (P20), y presenta una duración muy corta; la segunda es a los 50 días p.n. (P50), y se clasifica como refractaria, ya que si durante este periodo de reposo se produce algún estímulo de crecimiento, el FP no responde y no entra en anagén hasta el día 80 p.n. aproximadamente; y la tercera telogén se produce a día 90 p.n. (P90), y se clasifica como

competente, produciéndose respuesta ante un estímulo y entrando en anagén (Muller-Rover et al., 2001). Estos periodos de telogén pueden variar según la cepa de ratón, y a partir de la tercera telogén se considera que los FPs ya no están sincronizados.

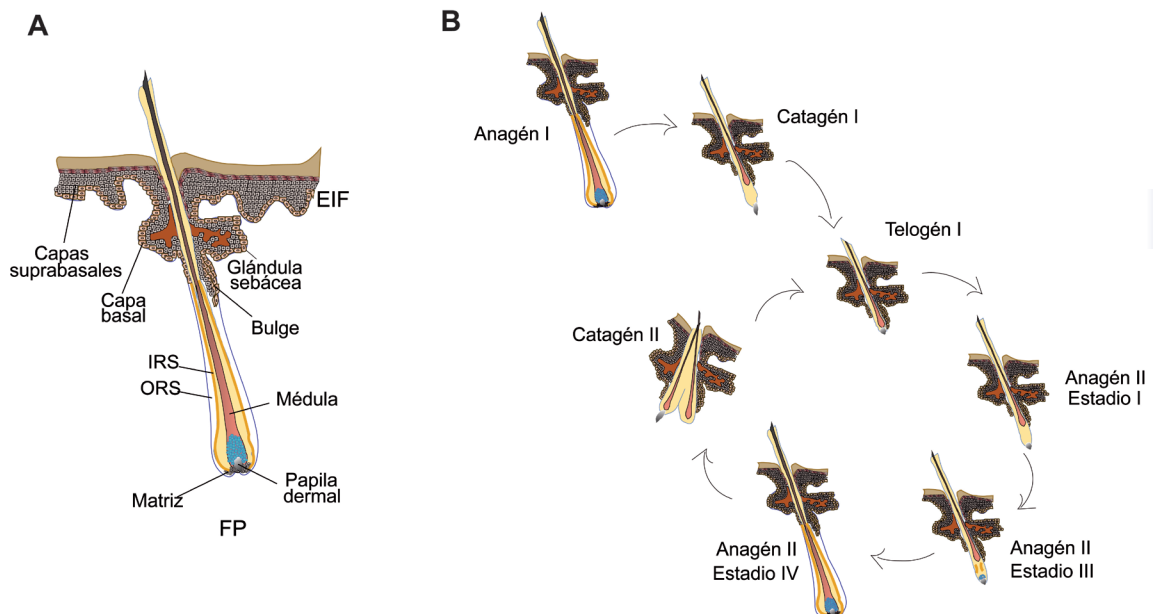


Figura 7. Representación esquemática de la estructura del folículo piloso y del ciclo del pelo. (A) El esquema representa las diferentes partes de un folículo piloso desarrollado (FP), la glándula sebácea, y la epidermis interfolicular (EIF). (B) Esquema del ciclo del FP en el que se representan las variaciones en los componentes del FP en los diferentes estadios de la anagén, y en las fases de degeneración (catagén) y reposo (telogén).

El crecimiento del FP implica la activación de las células madre de la región prominente por señales externas, siendo la vía de señalización Wnt/ β -catenina una de las más importantes, asociándose la presencia de β -catenina nuclear a la entrada en fase de anagén, promoviendo la especificación de la matriz para su diferenciación en los diferentes linajes del FP (Millar, 2002; Blanpain and Fuchs, 2006; Fuchs and Horsley, 2008), mientras que está ausente en telogén (Deschene et al., 2014; Lien et al., 2014). Otras vías, factores y proteínas importantes en piel y el FP son la ciclina D1, cuya sobreexpresión se relaciona con proliferación (Rodríguez-Puebla et al., 1999), la quinasa JnK, importante en proliferación, diferenciación y mantenimiento de la homeostasis (Szabowski et al., 2000; Chen et al., 2001), la vía de Notch, esencial para la diferenciación de los queratinocitos (Nickoloff et al., 2002; Estrach et al., 2008), y enzimas del metabolismo del ácido retinoico, como la aldehído deshidrogenasa 1a3 (Aldh1a3), involucrada en todo el ciclo del pelo (Everts et al., 2007).

4.4. Carcinogénesis química en piel de ratón.

El modelo de carcinogénesis química de piel de ratón en dos estadios representa un paradigma para el estudio de la progresión tumoral, permitiendo diseccionar las etapas de iniciación, promoción y progresión (Boutwell, 1974; Hennings and Yuspa, 1985; Yuspa, 1994; Yuspa et al., 1996). La iniciación mediante la utilización de una única dosis de un carcinógeno [generalmente 7,12-dimetil-benzantraceno (DMBA)], origina una mutación específica en las células de la piel de ratón, en el codón 61 del oncogén H-ras (Balmain et al., 1984; Brown et al., 1986; Quintanilla et al., 1986). La promoción mediante la aplicación repetida de un promotor tumoral [el éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)] proporciona ventajas de crecimiento a las células mutadas sobre las células vecinas dando lugar a su expansión selectiva originando lesiones premalignas o papilomas, que consisten en un núcleo estromal rodeado de epidermis hiperplásica (DiGiovanni, 1992). La mayoría de los papilomas involucionan, pero una pequeña proporción pueden progresar a un estado más avanzado (asociado a la inactivación de p53) y originar carcinomas de células escamosas (SCC), y eventualmente, pueden dar lugar (tras la aneuploidía de H-ras mutado) a carcinomas de células fusiformes (SpCC) (Stenback, 1980; Balmain et al., 1984; Ewing et al., 1988). Los diferentes estadios de la progresión tumoral se clasifican en función de la presencia o pérdida de expresión de una serie de marcadores celulares específicos.

4.5. Inflamación y progresión tumoral.

Durante muchos años el cáncer se consideró como un proceso que dependía exclusivamente de las células tumorales, pero estudios posteriores pusieron de manifiesto que depende de una densa red de interacciones entre las células tumorales y el estroma (Hanahan and Weinberg, 2011). Uno de los aspectos más importantes de la relación entre el tumor y el microambiente es la capacidad de las células cancerosas de modular la respuesta inflamatoria favoreciendo, entre otros mecanismos, la inducción de linfocitos T reguladores (T_{reg}), o la diferenciación de macrófagos hacia un fenotipo denominado como macrófagos asociados a tumor de tipo 2 (TAM M2), así como la inducción de células supresoras derivadas del linaje mieloide (MDSCs) o precursores mieloides (Mots and Coukos, 2013). Los precursores mieloides son una población heterogénea de células que se expanden en procesos como el cáncer, inflamación e infecciones (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Esta población incluye a los progenitores mieloides propiamente dichos y a las células mieloides inmaduras (IMC, compuestas de macrófagos, granulocitos y células dendríticas inmaduras), y se caracterizan por expresar en su superficie los marcadores CD11b y Gr-1, tener una baja expresión del marcador de macrófagos F4/80, y alta expresión de arginasa 1 y óxido nítrico sintasa inducible (NOSi).

5. Los factores Snail en la homeostasis y carcinogénesis de piel.

5.1 Snail1: estudios con ratones transgénicos.

Varios estudios han analizado el papel de Snail1 en la piel, demostrando que se expresa en la morfogénesis del FP (Jamora et al., 2005). Además, ratones que sobreexpresan Snail1 en los queratinocitos de la epidermis presentan un alto índice proliferativo, incremento en la vascularización, y un aumento en células inflamatorias como linfocitos CD4⁺, CD8⁺, y Tyδ, favoreciendo así una respuesta inflamatoria pro-tumoral (Du et al., 2010b). Asimismo, la sobreexpresión de Snail1 en la epidermis origina de forma espontánea carcinomas de células basales (BCC), SCC, y carcinomas de glándulas sebáceas, y en ausencia de *p53* origina un aumento en la formación de tumores espontáneos y en la tasa de metástasis (De Craene et al., 2014).

25

5.2. Snail2: estudios con ratones transgénicos.

Estudios previos han demostrado que ratones que sobreexpresan Snail2 no presentan defectos morfogenéticos, aunque en la edad adulta presentan leucemia aguda, sarcomas de tejidos blandos (Perez-Mancera et al., 2005), alteraciones cardíacas en algunos casos (Perez-Mancera et al., 2006) y desarrollan una mayor cantidad de tejido adiposo blanco (Perez-Mancera et al., 2007). En la presente tesis utilizamos el modelo de ratón mutante nulo de *Snail2* para analizar su papel en la piel y en la carcinogénesis química.

5.2.1. Características del ratón *Snail2*^{-/-}.

El ratón mutante nulo de *Snail2* (*Snail2*^{-/-}) fue generado en el laboratorio de Thomas Gridley mediante el reemplazamiento de la región de los dedos de zinc (exones 2 y 3) por el gen reportero *LacZ* y el gen *Neo*^R que confiere resistencia a neomicina (Jiang et al., 1998b). Tras la traducción se origina una proteína quimérica formada por los 120 primeros aminoácidos de Snail2 y la enzima β-galactosidasa, por lo que el análisis de la actividad β-galactosidasa permite inferir de forma indirecta los lugares y niveles de expresión de *Snail2*. Los ratones *Snail2*^{-/-} son viables, pero presentan una serie de anormalidades, como un peso corporal menor, tanto al nacimiento como en edad adulta, comparado con los ratones silvestres (*Snail2*^{+/+}) y heterocigotos (*Snail2*^{+/-}). Además, los ratones *Snail2*^{-/-} presentan parches de despigmentación en vientre, cola y patas posiblemente debido a defectos en la migración de las células de la cresta neural que dan lugar a los melanoblastos (Tribulo et al., 2004), padecen anemia macrocítica, y acumulan menos grasa blanca que los ratones *Snail2*^{+/+} y mucha menos que los ratones que sobreexpresan *Snail2* (Perez-Mancera et al., 2007).

Respecto a la relación de *Snail2* con el sistema inmune/inflamatorio, *Snail2* se expresa en precursores mieloides y linfoides, y en células madre hematopoyéticas, y su delección origina alteraciones en la vía SCF/c-kit (asociada a la hematopoyesis, melanogénesis y gametogénesis) (Inoue et al., 2002). En cuanto a los linajes hematopoyéticos, los ratones *Snail2*^{-/-} muestran alteraciones en el desarrollo de células progenitoras eritroides y de células T, sin modificarse la población de células B. Los ratones *Snail2*^{-/-} son más radiosensibles que los ratones *Snail2*^{+/+}, muestran un descenso en el número de células sanguíneas periféricas, y aumento de microhemorragias y microabcesos sugiriendo que *Snail2* protege del daño genotóxico en los progenitores hematopoyéticos y pro-linfocitos B (Inoue et al., 2002; Perez-Losada et al., 2002; Wu et al., 2005).

En el contexto de la homeostasis epidérmica, varios estudios previos han demostrado que *Snail2* es importante en los procesos de cicatrización de heridas, donde tiene lugar una TEM parcial (revisado en Thiery et al., 2009). *Snail2* se expresa en los márgenes de las heridas y los ratones *Snail2*^{-/-} son defectivos en este proceso, observándose que el crecimiento de queratinocitos, provenientes de explantes de piel de ratones *Snail2*^{-/-}, está seriamente afectado (Savagner et al., 2005; Arnoux et al., 2008; Hudson et al., 2009). Estudios previos del efecto de la delección de *Snail2* en los FPs durante el desarrollo embrionario y primera semana post-natal mostraron un retraso en la aparición de pelo y en el oscurecimiento de la piel en ratones *Snail2*^{-/-} (Parent et al., 2010).

Trabajos previos de nuestro grupo caracterizaron inicialmente las consecuencias de la delección constitutiva de *Snail2* en la piel, utilizando el modelo de ratón *Snail2*^{-/-} (Molina-Ortiz, P., 2010). El análisis de la actividad β-galactosidasa mostró que *Snail2* se expresa fundamentalmente en las células de la capa basal y en la región prominente del FP (Figura 8A), tal como se había descrito previamente (Parent et al., 2004). Mediante ensayos de hiperproliferación y estudio de marcadores de diferenciación se observó un descenso en ambos parámetros en los ratones *Snail2*^{-/-} en relación a los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/-} (Figura 8B-D). Adicionalmente, el estudio de cultivos primarios de queratinocitos mostró la deficiencia clonogénica de los queratinocitos provenientes de ratones *Snail2*^{-/-} (Figura 8E). Asimismo, estudios iniciales de carcinogénesis química de piel en ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-} (Molina-Ortiz, P., 2010) mostraron que la delección de *Snail2* origina un comportamiento bifásico con un retraso inicial en la aparición de papilomas, y un aumento exponencial en el número y tamaño de las lesiones. El estudio histopatológico de las lesiones mostró un incremento en la progresión a SCC en los ratones *Snail2*^{-/-} comparado con los ratones *Snail2*^{+/+}, indicando que la ausencia de *Snail2* provoca un aumento en la malignización

de las lesiones, aunque se desconocía el mecanismo responsable de dicho efecto.

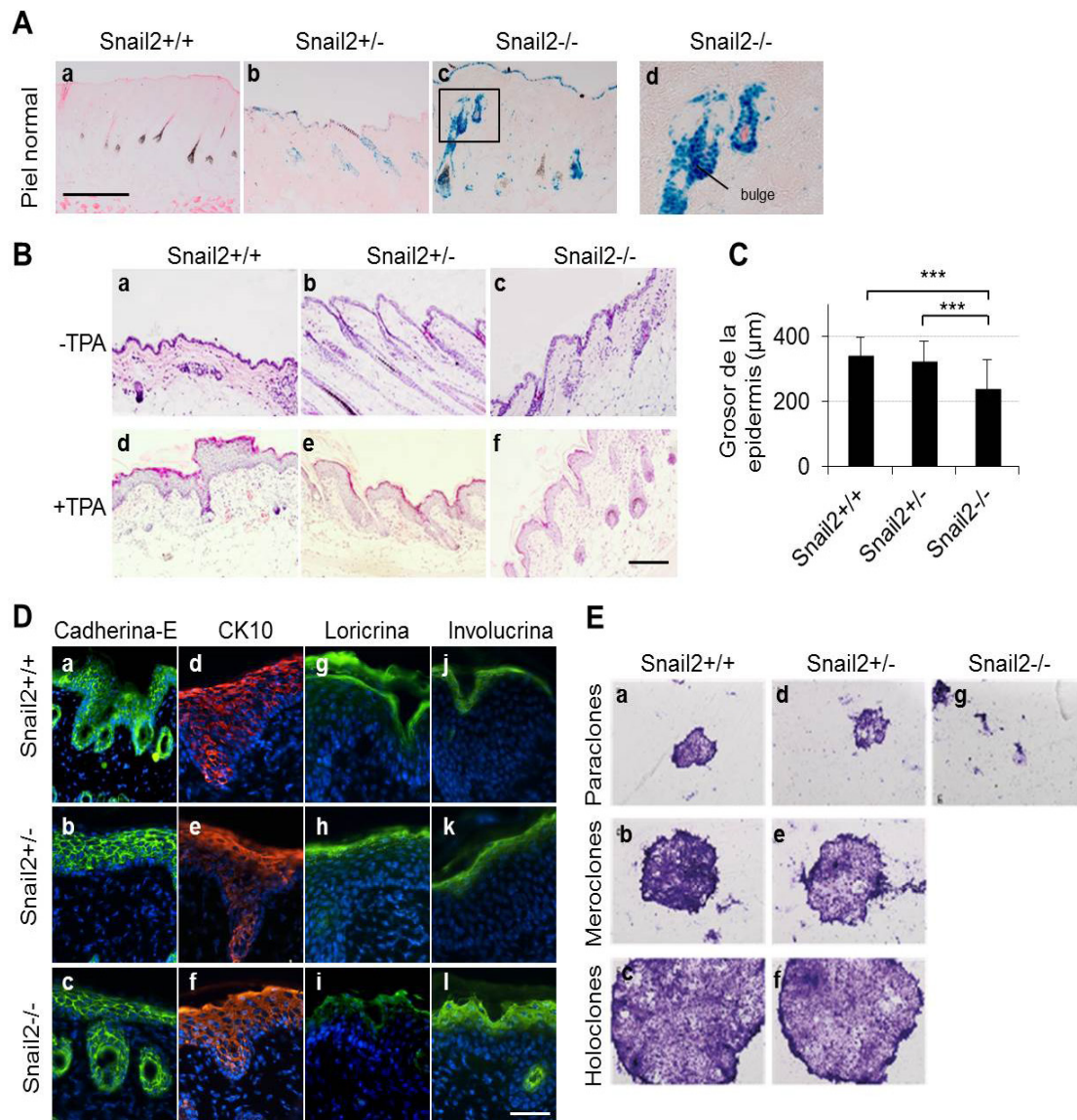
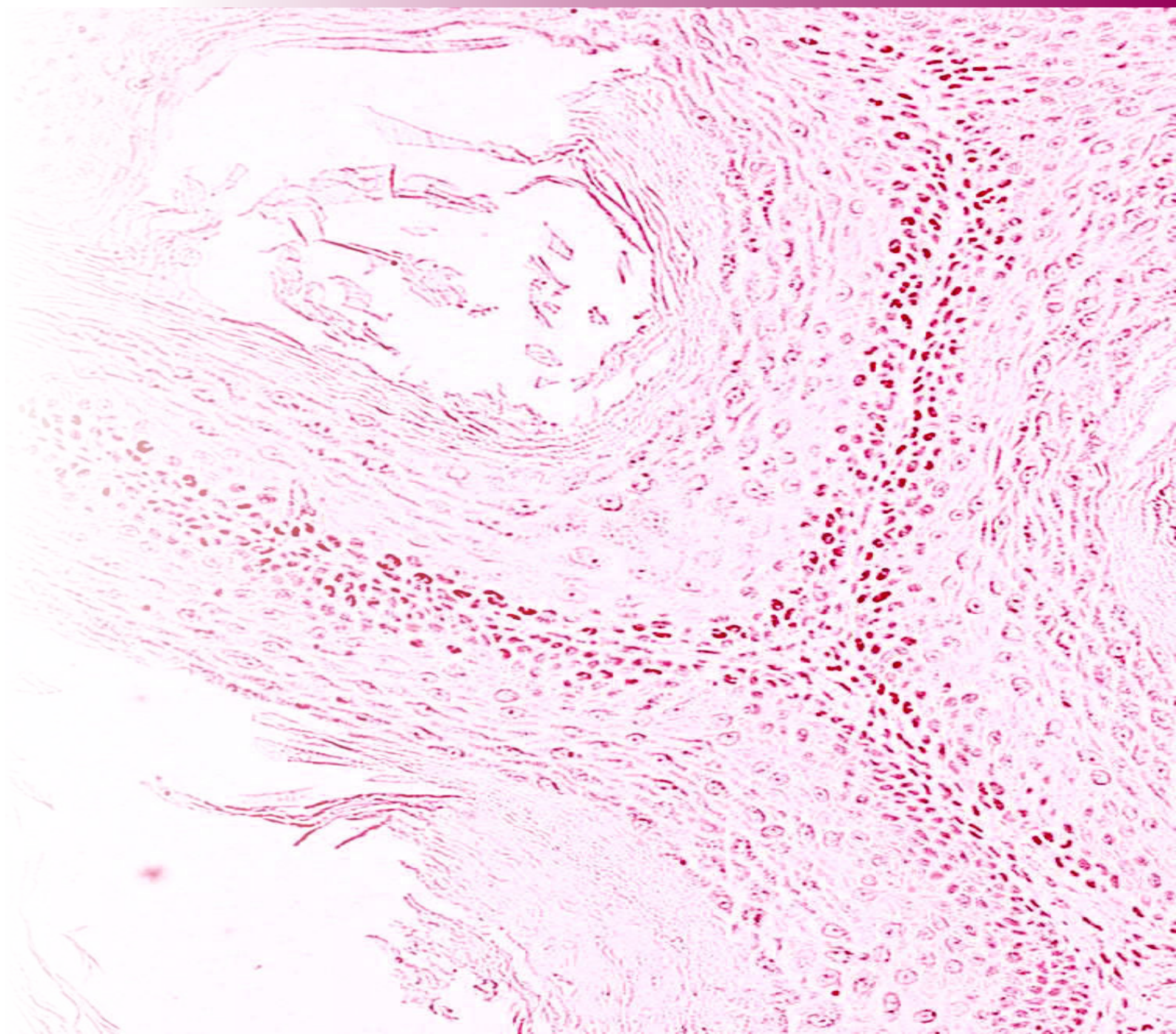


Figura 8. Resumen de datos previos del grupo en ratones *Snail2*^{-/-}. (A) Expresión de Snail2 en piel mediante tinción de β-galactosidasa en pieles de ratones *Snail2*^{+/+} (control) (a), *Snail2*^{+/-} (b) y *Snail2*^{-/-} (c, d). El panel d muestra la región ampliada, indicada por un recuadro en el panel c. Barra: 200 μm. (B) H/E de pieles de ratones control y tratados con TPA de los tres genotipos *Snail2*. Escala: 200 μm. (C) Cuantificación del grosor de la epidermis en los tres genotipos *Snail2* tras el tratamiento con TPA. (D) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de cadherina-E, CK10, loricrina e involucrina de pieles tratadas con TPA de ratones *Snail2*^{+/+}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-}. Los núcleos están tenidos con DAPI. Escala: 200 μm. (E) Imágenes de las diferentes colonias generadas por los queratinocitos primarios aislados de ratones recién nacidos *Snail2*^{+/+} (a-c), *Snail2*^{+/-} (d-f) y *Snail2*^{-/-} (g).

OBJETIVOS

29



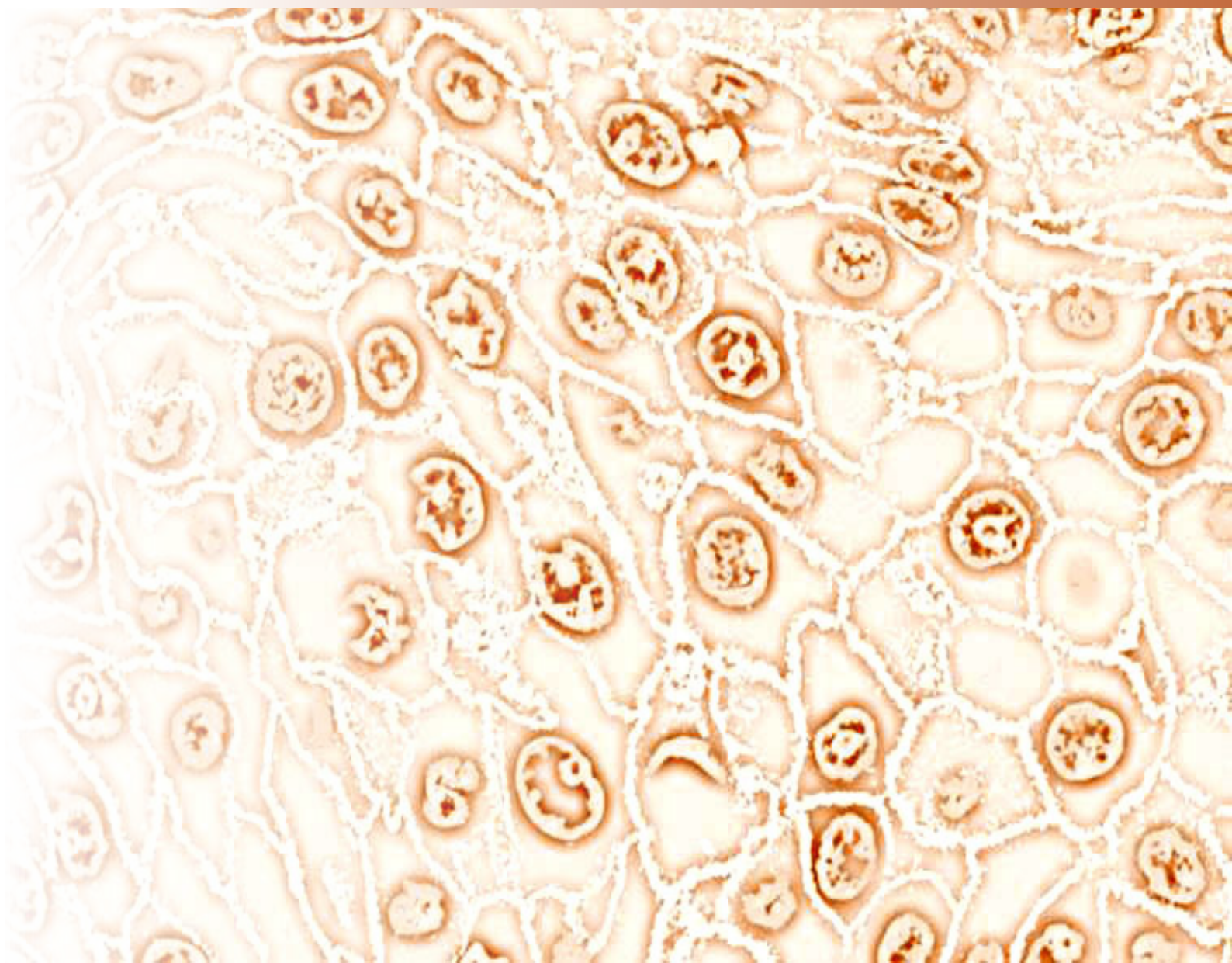
Estudios previos han mostrado que la deficiencia de Snail2 induce alteraciones significativas en la homeostasis de las células hematopoyéticas y de la epidermis, así como una respuesta aberrante a la carcinogénesis de piel de ratón. Sin embargo, se desconocen los mecanismos subyacentes a esta respuesta anómala y su posible relación con la función de Snail2 en el sistema hematopoyético. Por otro lado, pese a que Snail1 y Snail2 son dos factores de transcripción con una alta homología, presentan funciones específicas de cada uno, tanto en desarrollo embrionario como en progresión tumoral, aunque existe poca información acerca de las bases moleculares causantes de estas diferencias.

Como objetivos generales de esta tesis, nos planteamos caracterizar el papel de Snail2 en el ciclo del folículo piloso, así como en la homeostasis epidérmica relacionada con la respuesta a la carcinogénesis química, y la relevancia de este factor en la respuesta inflamatoria originada en dicho proceso tumoral (PARTE 1). Además, también nos propusimos caracterizar la importancia de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2 en su actividad represora e inducción de TEM, y estudiar los dominios SNAG y SLUG de Snail2 en la capacidad de inducir TEM (PARTE 2). Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización del papel de Snail2 en el ciclo del folículo piloso y carcinogénesis química de ratón.
 - 1.1. Función de Snail2 en el folículo piloso.
 - 1.2. Respuesta a la carcinogénesis química en función de la presencia y dosis génica de *Snail2*.
 - 1.3. Análisis del componente inflamatorio en la carcinogénesis química de piel de ratón.
2. Caracterización funcional de los dominios de unión a DNA de Snail1 y Snail2, y los dominios SNAG y SLUG de Snail2.
 - 2.1. Análisis *in silico* de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2.
 - 2.2. Caracterización funcional de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2.
 - 2.3. Contribución de la organización de las cajas-E de los promotores de *cadherina-E* a la represión mediada por Snail1 y Snail2.
 - 2.4. Contribución de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2 al proceso de TEM.
 - 2.5. Contribución de los dominios SNAG y SLUG de Snail2 al proceso de TEM.
 - 2.6. Relevancia de la fosforilación de la serina 4 de Snail2 al proceso de TEM.

MATERIALES Y MÉTODOS

33



1. Modelado computacional.

Con el fin de analizar el reconocimiento de secuencia ZF-DNA, llevamos a cabo el modelado de homología tridimensional de Snail1 y Snail2. La secuencia de aminoácidos de las proteínas se obtuvieron de la base de datos NCBI (Gene ID: 20613 y 20583). A continuación, mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se buscó un homólogo de ZFs cercano con una estructura tridimensional disponible en PDB (Protein Data Bank). Los resultados mostraron que una proteína de seis ZFs (código PDB 2113) era adecuada como modelo, con un 41% de homología de identidad con el dominio DBD de Snail1 y Snail2. El modelado de homología de las proteínas fue llevado a cabo con el servidor automático CPH v3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/CPH-models-3.0/). La validación se realizó con el software PROCHECK, para obtener el gráfico Ramachandran y ERRAT. Posteriormente, la estructura se relajó usando un protocolo de minimización de energía de 2000 pasos de máxima pendiente y 1000 pasos de gradientes conjugados Polak-Ribiere con un campo de fuerza AMBER 99sb. Estos cálculos se realizaron con el paquete informático GROMACS 4.5. La secuencia del DNA con la que es capaz de formar interacciones la proteína molde se mutó manualmente para parecerse al posible modelo de reconocimiento de caja-E (CAGGTG), y se ajustó el modelo. Después se llevó a cabo un protocolo de minimización, homólogo al primero. Finalmente, la interacción proteína-DNA se describió mediante la utilización del visor PyMOL.

2. Construcciones de DNA.

En la presente tesis se han utilizado vectores de expresión generados previamente en nuestro grupo o cedidos por distintos laboratorios, descritos en las Tablas I y II, y en las Figuras 9 y 10. Adicionalmente, en este trabajo, se han generado mutantes mediante mutagénesis dirigida (Zheng et al., 2004) de las cajas-E de los promotores de *cadherina-E* humano y murino, consistente en la sustitución del primer y último nucleótido de cada caja-E por adeninas (CAGGTG → AAGGTA) que destruye por completo la secuencia consenso. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos recogidos en la Tabla III.

Tabla I: Vectores de expresión en eucariotas.

Vectores de expresión	Especie	Mutación	Tag	Referencia
pcDNA3-mSnail1-HA	Ratón	Silvestre	HA	Peinado et al. 2005
pcDNA3-mSnail2-HA	Ratón	Silvestre	HA	Bolos et al. 2003
pcDNA3-mSnail1-ZF1	Ratón	C156A	-	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail1-ZF2	Ratón	C182A	-	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail1-ZF3	Ratón	C210A	-	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail1-ZF4	Ratón	C238A	-	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail1-ZF1/2	Ratón	C156A/C182A	-	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail1-ZF2/3/4	Ratón	C182A/C210A/C238A	-	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail1-ZF3/4	Ratón	C210A/CC238A	-	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail1-ZF1/2/4	Ratón	C156A/C182A/C238A	-	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail2-ZF1	Ratón	C131A	HA	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail2-ZF2	Ratón	C162A	HA	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail2-ZF3	Ratón	C188A	HA	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail2-ZF4	Ratón	C216A	HA	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail2-ZF5	Ratón	C244A	HA	Villarejo et al. 2013
pcDNA3-mSnail2-ΔSNAG	Ratón	ΔSNAG	HA	Molina-Ortiz et al. 2012
pcDNA3-mSnail2-ΔSLUG	Ratón	ΔSLUG	HA	Molina-Ortiz et al. 2012
pcDNA3-mSnail2-S4A	Ratón	S4A	HA	Molina-Ortiz et al. 2012
pcDNA3-mSnail2-S4D	Ratón	S4D	HA	Molina-Ortiz et al. 2012

Tabla II: Vectores testigos utilizados en esta memoria.

Vectores testigos	Especie	Tag	Referencia
pGL2-mCadherina-E (-178/+92)	Ratón	LUC	Bolos et al., 2003
pGL2-hCadherina-E (-178/+92)	Humano	LUC	Comijn et al. 2001
pCMV-βGalactosidasa	-	β-GAL	Promega

Tabla III: Oligonucleótidos empleados para la generación de los mutantes de las cajas-E de los promotores de cadherina-E humano y de ratón.

Construcción	Orientación	Secuencia*
pGL2-mCadherina-E mut E1	Fw Rw	5' GCCACCTGAAGGTACGTCCCCAGCCAATCAG 3' 5' CTGGGGACGTACCTTCAGGTGGCAGCCAAGGAAC 3'
pGL2-mCadherina-E mut E2	Fw Rw	5' TTGGCTGCAACCTACAGGTGCGTCCCCAGC 3' 5' GGACGCACCTGTAGGTTGCAGCCAAGGAACTGCAG 3'
pGL2-mCadherina-E mut Epal	Fw Rw	5' GGCTGCAACCTAAAGGTACGTCCCCAGCCAATCAGCGGCG 3' 5' CTGGGGACGTACCTTTAGGTTGCAGCCAAGGAACTGCAGG 3'
pGL2-mCadherina-E mut E3	Fw Rw	5' GCGGGCTAACCTAGCGGCCGCAGCCTCTG 3' 5' GGCCGCTAGGTTAGCCCGCAGGCACCG 3'
pGL2-hCadherina-E mut E1	Fw Rw	5' GGCCGGAAGGTAACCCTCAGCCAATCAGCGG 3' 5' CTGAGGGTTTACCTTCCGGCCACAGCCAATCAGCA 3'
pGL2-hCadherina-E mut E3	Fw Rw	5' CGGGGCTAACCTAGCTGCAGCCACGCACC 3' 5' CTGCAGCTAGGTTAGCCCCGGAGGCACC 3'
pGL2-hCadherina-E mut E4	Fw Rw	5' ACTGCAAAGAACCTATGAGCTTGCGGAAGTCAGTTCAGACTCC 3' 5' CGCAAGCTCATAGGTTCTTTGCAGTTCGACGCCACT 3'

*En negrita se indican los nucleótidos mutados introducidos en cada construcción.

3. Anticuerpos.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo, así como las técnicas específicas en las que se ha empleado se describen en la Tabla IV.

Tabla IV: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la memoria.

Proteína	Especie (tipo)*	Procedencia	Dilución IF/IHQ/WB/FC**
Anticuerpos primarios:			
Cadherina-E	Rata (mc)	M.Takeichi	1:200/1:100/1:200/--
Ciclina D1	Ratón (mc)	DAKO	--/1:200/--/--
Citoqueratina 8	Ratón (mc)	Progen	--/1:100/--/--
Citoqueratina 10	Conejo (pc)	Covance	--/1:100/--/--
Citoqueratina 13	Ratón (mc)	Progen	--/1:100/--/--
Loricrina	Conejo (pc)	Covance	1:250/1:200/--/--
β -catenina	Ratón (mc)	BD Transduction	1:250/1:200/--/--
CD11b-PECy7	Conejo (pc)	BD Pharmigen	--/--/1:250
Gr-1-PE	Conejo (pc)	BD Pharmigen	--/--/1:500
CD4-PE	Conejo (pc)	BD Pharmigen	--/--/1:100
CD8-FITC	Conejo (pc)	BD Pharmigen	--/--/1:100
F4/80-FITC	Conejo (pc)	BD Pharmigen	--/--/1:100
CD19-PE	Conejo (pc)	BD Pharmigen	--/--/1:100
HA	Rata (mc)	Roche	1:50/--/1:100/-- 20 μ g (ChIP)
Vimentina	Ratón (mc)	Dako	1:200/--/1:5000/--
Fibronectina	Ratón (mc)	BD Transduction	--/--/1:5000/--
Cadherina-N	Ratón (mc)	Zymed Laboratories	--/--/1:200/--
Snail1	Ratón (mc)	Cell Signaling	1:200/--/1:1000/-- 20 μ g (ChIP)
α -Tubulina	Ratón (mc)	Sigma-Aldrich	--/--/1:5000/--
Anticuerpos secundarios:			
Anti-Conejo/Ratón	-	Kit LSAB (DAKO)	-
Rata-Alexa-488	Cabra (pc)	Molecular Probes	1:800/--/--
Ratón-Alexa-555	Cabra (pc)	Molecular Probes	1:800/--/--
Rata-HRP	Cabra (pc)	Nordic	--/--/1:10000/--
Ratón-HRP	Oveja (pc)	Amershan	--/--/1:5000/--

*: mc, anticuerpo monoclonal; pc, anticuerpo policlonal.

**: IF, Inmunofluorescencia; IHQ, Inmunohistoquímica en secciones parafinadas; FC, citometría de flujo; WB, Western blot; ChIP, inmunoprecipitación de cromatina.

4. Cultivos celulares.

Las líneas celulares empleadas en este trabajo fueron las siguientes:

- MDCK-II (“Madin Darby Canine Kidney”), línea epitelial derivada de epitelio simple de riñón de perro (ATCC, CRL-2936).
- HEK293T (“Human Embryonic Kidney”), línea epiteloide derivada de epitelio renal embrionario humano, que ha sido inmortalizada con el gen E1A de adenovirus y transformada con el antígeno T (ATCC, CRL-11268).
- NMuMG (“Normal Murine Mammary Gland”), línea derivada de epitelio mamario glandular de ratón (ATCC, CRL-1636).

Las distintas líneas celulares se crecieron en medio DMEM (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), 2 mM de L-Glutamina (Gibco), 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) y 32 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich). Adicionalmente, la línea NMuMG se creció en presencia de insulina a 10 µg/mL (Gibco). Todos los cultivos celulares se crecieron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de saturación de CO₂.

39

5. Transfecciones transitorias.

Todas las transfecciones se realizaron con el reactivo Lipofectamina (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante, con las siguientes consideraciones:

- Para los ensayos de actividad promotora se sembraron 2×10^4 células (MDCK-II) o 5×10^4 células (HEK293T) por pocillo en placas MW24 (Falcon) (Moreno-Bueno et al., 2009). Tras 24 h se transfectaron con 200 ng/pocillo del vector reportero que contiene el promotor de *cadherina-E* (murino o humano) fusionado al gen que codifica la luciferasa, 10 ng/pocillo del vector testigo pCMV-βGal, utilizado como control de eficiencia de la transfección, y los vectores de expresión de los factores de transcripción Snail1 (75 ng/pocillo) y Snail2 (100 ng/pocillo).
- Para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se sembraron 1×10^6 células HEK293T o NMuMG en placas P100 (Falcon), tras 24 h se transfectaron con 15 µg de los correspondientes vectores de Snail1, Snail2, o sus correspondientes mutantes.
- Para los ensayos de inmunofluorescencia, se sembraron $3,5 \times 10^5$ células MDCK-II en placas P60 con cristales de 12 mm de diámetro. Tras 24 h de incubación se transfectaron con 3 µg de los plásmidos indicados en cada ensayo.

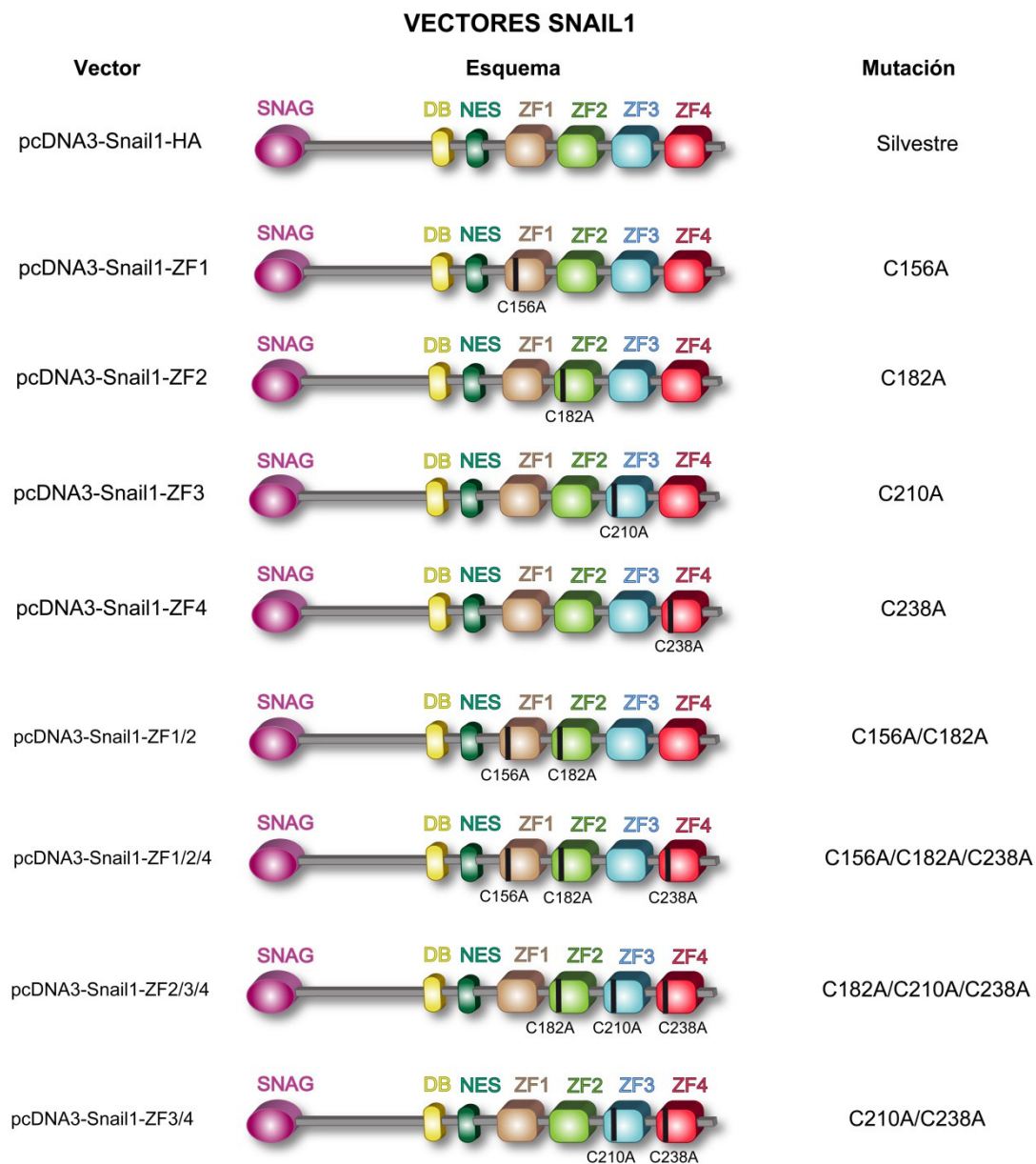


Figura 9. Esquema de las construcciones de Snail1. Esquema de los mutantes de Snail1 empleados para estudiar los ZFs. Se incluyen los ZFs mutados individualmente y construcciones con diferentes combinaciones de ZFs mutados, indicándose la/s cisteína/s mutada/s en cada caso (barra vertical negra).

VECTORES SNAIL2

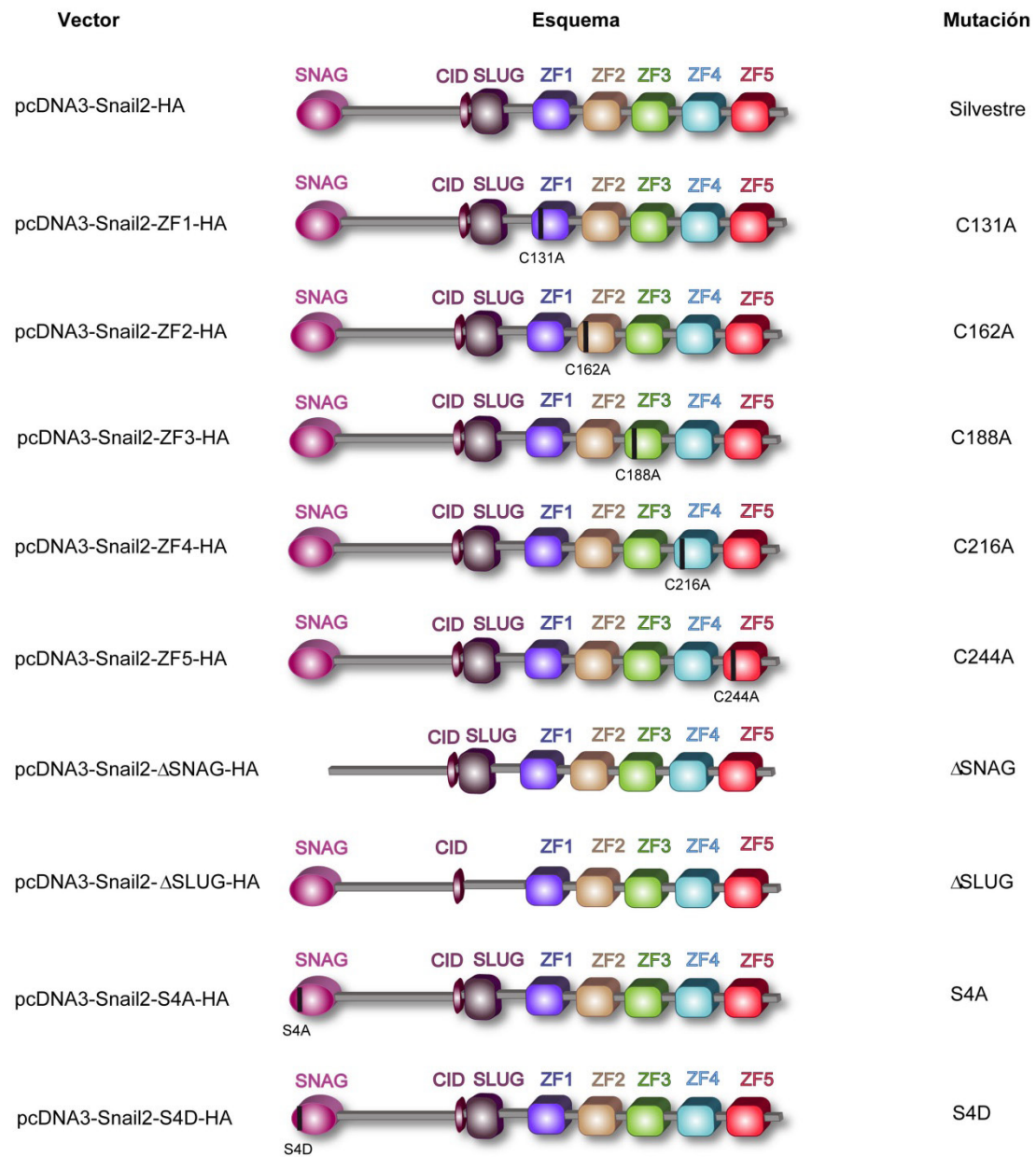


Figura 10. Esquema de las construcciones de Snail2. Esquema de los mutantes de Snail1 empleados para estudiar los ZFs. Se incluyen los ZFs mutados individualmente, indicándose la cisteína mutada en cada caso (barra vertical negra), y los mutantes del dominio SNAG y SLUG, y de la serina 4.

6. Transfecciones estables.

Se sembraron 1×10^6 células MDCK-II en placas P60 (Falcon) y tras 24 h se transfectaron con pcDNA3-Snail1-HA, pcDNA3-Snail2-HA, los mutantes indicados, o con el plásmido control pcDNA3-HA (CMV). A las 48 h se añadió el antibiótico de selección G418 (Gibco) a una concentración final de 500 $\mu\text{g/mL}$, y se trataron durante 2-3 semanas para obtener colonias individuales. Al menos 10

clones independientes fueron seleccionados y caracterizados de cada transfección.

7. Ensayos de actividad promotora.

Los ensayos de actividad promotora se llevaron a cabo según el método descrito previamente (Moreno-Bueno et al., 2009). La actividades de los promotores de *cadherina-E* murino y humano se determinaron en células MDCK-II o HEK293T transfectadas con los plásmidos indicados en cada experimento (pcDNA3-Snail1, pcDNA3-Snail2-HA, o sus respectivos mutantes, el promotor correspondiente, y CMV-βgalactosidasa) (según se indica en el apartado 4). A las 24 h de la transfección, las células se lavaron con PBS1x y se lisaron con tampón de lisis pasivo (Promega) durante 15 min a temperatura ambiente (t.a.). Las actividades luciferasa y β-galactosidasa de los extractos resultantes se cuantificaron con el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay* (Promega) utilizando un luminómetro Lumat LB9507 (Berthold Technologies). La actividad relativa luciferasa/β-galactosidasa se normalizó con respecto a la actividad detectada en las células control transfectadas con el vector vacío (pcDNA3-HA). Los datos presentados en esta tesis son el resultado de 5 experimentos independientes en los que cada condición experimental se analizó por triplicado. La barra de error en las representaciones gráficas representa la media±desviación estándar. El grado de significación de los datos se analizó mediante la prueba bilateral del test t-Student usando el programa informático Microsoft Excel 2010.

8. Genotipado de *Snail2* en los modelos de ratón.

Los ratones heterocigotos para *Snail2* (*Snail2*^{+/−}) fueron cedidos por el Dr. Thomas Gridley (The Jackson Laboratory). Los ratones se mantuvieron en régimen de cruces rotacionales entre heterocigotos, con el fin de evitar la consanguineidad entre camadas.

Para el genotipado del alelo *Snail2* se extrajo DNA genómico de la cola de ratones de 20 días y se llevaron a cabo las PCR correspondientes con el reactivo *REDExtract-N-AmpTissue PCR kit* (Sigma-Aldrich), según las indicaciones del fabricante. Se determinó la presencia o no de los alelos *Snail2* y *LacZ* mediante PCR de 1 μL de DNA genómico. Las condiciones utilizadas fueron: 30 ciclos de amplificación 30 seg a 94°C; 30 seg a 62°C; 30 seg a 72°C. Los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla V.

Tabla V. Secuencia de oligonucleótidos para el genotipado de los ratones.

Alelo	Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño
Snail2	Snail2 5'	5'-AGAACGGAAGCTGTTTGGCTG-3'	~ 450pb
	Snail2 3'	5'-CTATTTGGTTGGTAAGCACATGAG-3'	
LacZ	LacZ 5'	5'-ACTATCCCGACCGCCTTACT-3'	~ 300pb
	LacZ 3'	5'-TAGCGGCTGATGTTGAACTG-3'	

9. Ensayo de crecimiento del folículo piloso.

Ratones *Snail2*^{+/+}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-} se rasuraron a día 20, 50 o 90 post-natal, y se observaron diariamente hasta la aparición de pelo en al menos uno de los genotipos. Al final del experimento, la piel del dorso se dividió en varias porciones para su congelación, obtención de RNA y fijación en formol. Posteriormente, se obtuvieron las secciones de los bloques de parafina y OCT para analizar las muestras por H&E e inmunofluorescencia (ver apartados 12 a 14).

10. Carcinogénesis química de piel de ratón.

La carcinogénesis química se llevó a cabo aplicando el protocolo clásico de DMBA/TPA (Quintanilla et al., 1986; Brown et al., 1986). Este protocolo se aplicó a ratones de 6-8 semanas de edad, rasurados el día de antes del inicio del tratamiento. El día de la iniciación se aplicó 200 µL de una solución de 160 µg/mL de DMBA (9,10 dimetil-1,2-benzantraceno; Sigma-Aldrich) en acetona en la piel del dorso del ratón, y tras siete días se comenzó la aplicación, dos veces por semana, del promotor tumoral, aplicando 200 µL de una solución de 62,5 µg/mL de TPA (éster de forbol, 12-O-tetra-decanoilforbol-13-acetato; Sigma-Aldrich) en acetona durante 16 semanas. El tamaño y número de las lesiones se analizó semanalmente. La duración de los experimentos fue de 36 semanas excepto en los experimentos de trasplante de médula ósea sobre ratones *Snail2*^{+/+} (26 semanas) y *Snail2*^{-/-} (20 semanas). Una vez concluido el experimento se realizaron las necropsias recogiendo las muestras tisulares de interés para su posterior análisis (ver apartados 12 a 14).

11. Trasplante de médula ósea.

Los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/-} se irradiaron con una dosis letal de 11 Gy, y los ratones *Snail2*^{-/-} con una dosis subletal de 6 Gy, empleando un irradiador gamma Cs-137 (Shepherd Mark). A las cuatro horas de la irradiación, se inyectó retro-orbitalmente 5x10⁶ células de médula ósea del donante correspondiente, obteniéndose los siguientes grupos de ratones: *Snail2*^{+/+} trasplantados con: a) médula ósea de ratones *Snail2*^{+/+} (*Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+}), o b) *Snail2*^{-/-}, (*Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-}); y ratones *Snail2*^{-/-}, trasplantados con: a) médula ósea de ratones *Snail2*^{-/-}, (*Snail2*^{-/-}_MO-

Snail2^{-/-}), b) *Snail2*^{+/+} (*Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/+}), o c) *Snail2*^{+/-} (*Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/-}). Transcurrido un mes desde el trasplante, se tomaron muestras de sangre y se genotipó los alelos *Snail2* y *LacZ* para comprobar si la reconstitución de médula había sido efectiva antes del inicio del tratamiento con DMBA/TPA como se ha descrito en el apartado 8.

12. Procesamiento de las muestras tisulares obtenidas en las necropsias.

Las lesiones y vísceras extraídas en las necropsias se fijaron en 3,7% de formaldehído o se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior procesamiento, según se ha descrito previamente (Moreno-Bueno et al., 2009), siguiendo los siguientes protocolos:

12.1. Inclusión en bloques de OCT.

Los bloques de OCT ("*Optimal Cutting temperature*" medium; Takara) se generaron a partir de muestras de tejidos congeladas en el caso de las pieles, mientras que el resto de muestras extraídas de ratones se incluyeron y orientaron directamente en un soporte fijo *TissueTeck* (Dako), que se rellenó con OCT y se congeló. Todo el proceso se realizó sobre nieve carbónica. Una vez obtenidos los bloques se cortaron secciones de 4 µm utilizando un criostato (Reichert-Jung *Cryocut* 1900; Leica) y se depositaron sobre portaobjetos (Dako) para su posterior análisis.

12.2. Inclusión en bloques de parafina.

Los bloques de parafina se generaron a partir de muestras de tejidos fijadas con formaldehído al 3,7% durante 24 h. Posterior a la fijación, las muestras se deshidrataron en baños progresivos de 30 min en etanol al 50%, 75%, y 100%, y finalmente se incubaron en xilol (Merck) 24 h. Las muestras deshidratadas se incluyeron en un baño de xilol:parafina (1:1) a 55°C durante 16 h, a continuación se embebieron en soportes metálicos rellenos con parafina (DC Panreac) a 55°C, y el bloque se dejó enfriar hasta su solidificación. Una vez obtenidos los bloques se cortaron secciones de 4 µm utilizando un micrótopo (Microtopo Rotatorio Tipo Minot, Leica), y se depositaron sobre portaobjetos (Dako) para su posterior análisis.

12.3. Análisis de las poblaciones hematopoyéticas mediante citometría de flujo.

Las muestras de sangre y médula ósea se centrifugaron a 1.200 rpm 5 min, y se lavaron con PBS. Las lesiones se disgregaron mecánicamente y se filtraron a través de filtros de 40 µm de tamaño de poro. Los filtrados se incubaron con el anticuerpo correspondiente según se indica en la Tabla IV durante 1 h a t.a. y se lavaron con PBS1x. Posteriormente se añadió yoduro de propidio o 7-AAD (7-amino-actinomicina D) para marcar las células muertas y poder descartarlas. Por último, las células resuspendidas en PBS1x con yoduro de propidio o 7AAD se analizaron

en el citómetro Cytomics FC 500MPL, y los datos se analizaron con el programa CXP (ambos de Beckman-Coulter).

13. Tinción con Hematoxilina/Eosina (H&E).

Las secciones de bloques de parafina se desparafinaron con xilol y se rehidrataron con baños sucesivos de etanol al 100%, 75% y 50%. Las secciones de bloques de OCT se fijaron en acetona (Sigma-Aldrich) a -20°C durante 30 min y se lavaron con PBS1x. Ambos tipos de muestras se tiñeron con una solución de hematoxilina (DC Panreac) durante 10 min a t.a. El exceso de colorante se eliminó con agua destilada, y a continuación se llevó a cabo una contratinción con una solución de eosina al 1% durante 30 seg a t.a. Finalmente, las muestras se deshidrataron en baños progresivos de 10 min en etanol al 50%, 75%, 100% y xilol, y se montaron con medio DEPEX (Dako).

14. Inmunodetección de marcadores en muestras tisulares.

14.1. Inmunohistoquímica.

Los cortes de tejido se desparafinaron y rehidrataron como se indica en el apartado 13. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de desenmascaramiento del antígeno inducido por calor (en autoclave de mesa a 103°C y 1 atm durante 2 min) sumergiendo los cortes en tampón citrato (10 mM citrato sódico pH 6,5). A continuación se inactivó la peroxidasa endógena del tejido con solución de bloqueo para dicho enzima (Dako) durante 20 min y se incubó con el anticuerpo primario a la dilución adecuada (ver Tabla IV) durante 20 min a t.a. La detección del anticuerpo primario se realizó mediante la actividad enzimática de la peroxidasa acoplada a los anticuerpos secundarios utilizando los métodos inmunohistoquímicos de tinción LSAB o EnVision (Dako), según se ha descrito (Moreno-Bueno et al., 2009), y siguiendo el protocolo del fabricante. En los controles negativos se omitieron los anticuerpos primarios.

14.2. Inmunofluorescencia.

Las muestras de tejidos incluidas en OCT se cortaron en secciones de 4 µm y se fijaron con 4% de paraformaldehído (PFA) a pH 7,4 durante 20 min. Posteriormente se permeabilizaron con 0,05% de Triton X-100 durante 15 min. Tras lavar dos veces con PBS1x durante 5 min, se trataron con solución de bloqueo (2% BSA en PBS1x) durante 30 min. Las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios (diluidos en solución de bloqueo, Tabla IV) en una cámara húmeda durante 1 h. Tras lavar las muestras 3 veces con PBS 1x durante 10 min, se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados (Tabla IV) durante 45 min en cámara húmeda. Posteriormente, los

núcleos se tiñeron con DAPI (Molecular Probes) durante 10 min. Finalmente, las preparaciones se montaron sobre portaobjetos usando *Mowiol* (Sigma-Aldrich). Todas las incubaciones se llevaron a cabo a t.a. Las muestras teñidas se examinaron utilizando un microscopio Nikon90i equipado con epifluorescencia acoplado a una cámara digital CCD Olympus DP70. El análisis y procesamiento de las imágenes capturadas se llevó a cabo utilizando el programa Adobe Photoshop CS2.

15. Detección de células apoptóticas en secciones de tejido.

Secciones de 4 µm obtenidas a partir de bloques de OCT se fijaron con 4% PFA a pH 7,4 durante 20 min a t.a. Posteriormente, se lavaron con PBS1x durante 30 min y se permeabilizaron con 0,1% citrato sódico pH 6,5, 0,1% Tritón X-100 a 4°C durante 2 min. Las células se tiñeron utilizando el kit “*In situ cell death detection*” (Roche), según las indicaciones del fabricante. La tinción fluorescente de las muestras se examinó y analizó según se describe en el apartado 14.2. El número de células apoptóticas se determinó mediante el conteo de núcleos marcados en tres campos diferentes de la misma muestra en, al menos, cinco muestras independientes.

16. PCR cuantitativa a tiempo real.

El cDNA se obtuvo a partir de 1 µg de RNA obtenido de las muestras de pieles o lesiones utilizando el *kit RNeasy* (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis del cDNA se utilizaron oligonucleótidos aleatorios y el sistema Superscript II (Life Technologies) como se ha descrito previamente (Moreno-Bueno et al., 2009). La PCR cuantitativa a tiempo real se llevó a cabo con el reactivo *SYBRGreen* (BioRad) y el aparato iQ5 de BioRad, según las recomendaciones del fabricante. Para calcular el factor de amplificación se utilizó el valor del ciclo umbral (Ct) como especifica el fabricante. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla VI.

17. Análisis de proteínas.

17.1. Inmunodetección de marcadores en células mediante inmunofluorescencia.

Las células MDCK-II crecidas al 60-70% de confluencia en cristales de 12 mm en placas P60, se transfectaron según se indica en el apartado 4, y transcurridas 24 h se fijaron en formaldehído al 3,7% durante 20min a t.a. Posteriormente, se permeabilizaron con 0,05% de Triton X-100 en solución de bloqueo (2% BSA en PBS1x) durante 15 min. Tras dos lavados de 5 min con PBS1x, se trató con solución de bloqueo durante 30 min. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario (diluidos según se indica en la Tabla IV) en cámara húmeda durante 1 h. Tras 3 lavados de 5 min con PBS1x, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados (Tabla IV). Los núcleos se tiñeron con DAPI (Molecular Probes) durante 10 min. Finalmente,

las preparaciones se montaron sobre portaobjetos usando *Mowiol* (Sigma-Aldrich). Todas las incubaciones se llevaron a cabo a t.a. La tinción fluorescente de las muestras se examinó usando un microscopio Nikon90i, equipado con epifluorescencia acoplado a una cámara digital CCD Olympus DP70, y un microscopio confocal LSM710 (Zeiss), y el procesamiento de las imágenes capturadas se realizó con los programas informáticos ImageJ y Adobe Photoshop CS2.

Tabla VI. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para qPCR de las muestras de los ratones.

Oligonucleótido	Secuencia
mJagged1 Fw	5' CTCACTCAGGCATGATAAACCCCTA 3'
mJagged1 Rw	5' GAAGTGGGCAATCCCTGTGT 3'
m c-jun Fw	5' GGGAGCATTTGGAGAGTCCC 3'
m c- jun Rw	5' TTTGCAAAAGTTCGCTCCCG 3'
mAldh1a3 Fw	5' CACAGGCTCCATTTGGTGG 3'
mAldh1a3 Rw	5' CAGCTTTTGAGGAAGAAGCC 3'
CyclinD1 Fw	5' TGCCATCCATGCGGAAA 3'
CyclinD1 Rw	5' AGCGGGAAGAACTCCTCT TC 3'
K15 Fw	5' AGCTATTGCAGAGAAAAACCGT 3'
K15 Rw	5' GGTCCGTCTCAGGTCTGTG 3'
mNotch1 Fw	5' TCTTACACGGTGTGCTGAGG 3'
mNotch1 Rw	5' GAATGGAGGTAGGTGCGAAG 3'
mWnt3a Fw	5' CCCAACTTCTGCGAACCTAA 3'
mWnt3a Rw	5' TCTCCGCCCTCAAGTAAGAA 3'
mWnt4 Fw	5' AACGGAACCTTGAGGTGATG 3'
mWnt4 Rw	5' GGACGTCCACAAAGGACTGT 3'
mWnt10a Fw	5' GCGCTCTGGGTAAACTGAAG 3'
mWnt10a Rw	5' CACACGGTTGTTGTGGAGTC 3'
mPostn Fw	5' TGCTGCCCTGGCTATATGAG 3'
mPostn Rw	5' GTAGTGGCTCCCACAATGCC 3'
mHes1 Fw	5' GTCACCTCGTTCATGCACTC 3'
mHes1 Rw	5' TCTGGAAATGACTGTGAAGCA 3'
m β -actin Fw	5' TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG 3'
m β -actin Rw	5' TGGAAATCCTGTGGCATCCATGAAAC 3'

17.2. Electroforesis e inmunotransferencia (Western blot).

Los clones estables fueron crecidos tal como se indica en el apartado 3, se lavaron una vez con PBS1x durante 5 min y se lisaron con RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% NP40), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (2 mM PMSF; 2 µg/mL leupeptina; 2 µg/mL aprotinina; 15 mM ortovanadato) durante 30 min a t.a. Posteriormente, se recogieron los lisados, se centrifugaron a 13.000 rpm 5 min, y los sobrenadantes se congelaron a -20°C hasta su utilización. La concentración de proteína en los extractos se cuantificó mediante el método del BCA utilizando el kit *Pierce BCA Protein Assay Kit* (ThermoScientific) y el lector de placas Synergy HF (Biotek).

Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 10-14% de acrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Immobilon-P (Millipore) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se bloqueó con TTBS (TBS1x + 0,01% Tween 20) y 5% leche desnatada, y las membranas se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución adecuada (ver Tabla IV) toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de 5 min con TTBS, se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado (ver Tabla IV) durante 45 min a t.a. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces con TTBS y las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia, usando el kit de detección *ECL chemiluminescence detection kit* (Amershan), siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos, la imagen mostrada corresponde a un experimento representativo de al menos dos realizados.

17.3. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizaron según se ha descrito previamente (Aparicio et al., 2004; Peinado et al., 2004b). Las proteínas se entrecruzaron al DNA incubando las células con 10 mM dimetiladipidimato (DMA) durante 45 min a t.a. y las uniones proteínas-DNA se fijaron con 1% formaldehído durante 15 min a t.a. A continuación, las células se lisaron en tampón de lisis (1% SDS; 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,0) y se sonicaron en un aparato Soniprep 150 (MSE) (14 ciclos en régimen de 30 seg ON con una amplitud de 6-10 micras seguidos de 40 seg OFF en hielo) con el fin de romper el DNA en fragmentos de 200-1000 pb. Los lisados sonicados se incubaron con la proteína A/G sepharosa dependiendo del anticuerpo primario para eliminar las uniones inespecíficas y posteriormente se incubaron con anticuerpo anti-HA, anti-Snail1 o con anti-IgG de rata o de ratón, utilizado como control negativo (ver Tabla IV), durante 1 h a 4°C. La cromatina inmunoprecipitada se lavó de manera sucesiva con tampón de dilución (0,01% SDS; 0,5% NP40; 1,2 mM EDTA; 16,7 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM

NaCl; inhibidores de proteasas), tampón con baja concentración en sales (0,1% SDS; 1% NP40; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl), tampón con alta concentración en sales (0,1% SDS; 1% NP40; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl), tampón de LiCl (0,25 M LiCl; 1% NP40; 1% desoxicolato de sodio; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8,0) y tampón Tris-EDTA, para posteriormente separar el DNA de la proteína unida al anticuerpo mediante incubación con 200 mM NaCl a 65°C durante no más de 16 h. El DNA inmunoprecipitado se purificó y se procedió a su amplificación por PCR cuantitativa. Los oligonucleótidos utilizados para el análisis por PCR se detallan en la Tabla VII. Se utilizó *SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) en el aparato iQ5 (Bio-Rad).

Tabla VII. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para qPCR de las muestras de ChIP.

Oligonucleótido	Secuencia
mCdh1 Fw	5' CATGTCTCCGTGGGTCAGA 3'
mCdh1 Rw	5' AGGTGGCAGCCAAGGAACT 3'
hCDH1 Fw	5' TCCTTTGTA ACTCCATGTCTCCCGT 3'
hCDH1 Rw	5' CGGGCAGGAGTCTAGCAGAAG 3'



Parte 1. Caracterización del papel de *Snail2* en el ciclo del folículo piloso y carcinogénesis química de piel de ratón.

Con el objetivo de caracterizar el papel de *Snail2* en el desarrollo del folículo piloso y en la carcinogénesis de piel de ratón hemos llevado a cabo diferentes experimentos en el modelo de ratón nulo de *Snail2* descrito previamente.

1.1. Función de *Snail2* en el folículo piloso.

En estudios previos del laboratorio se analizó el efecto en la piel de la delección de *Snail2* como se ha descrito en la Introducción (Molina-Ortiz, P., 2010). Concretamente, se caracterizaron los efectos en proliferación y diferenciación en la epidermis interfolicular (EIF) (Figura 8, A-D). Con el fin de profundizar en el papel de *Snail2* en la homeostasis epidérmica, decidimos analizar su implicación en el ciclo del folículo piloso (FP).

1.1.1. Efecto de la delección constitutiva de *Snail2* sobre el ciclo del folículo piloso.

Para estudiar la relevancia de *Snail2* en la homeostasis del FP, se analizó el efecto de su delección en las distintas etapas del desarrollo del FP, descritas en la Introducción. Un ensayo típico para analizar este proceso consiste en rasurar el dorso de la piel del ratón en la etapa de telogén o fase de reposo, y cuantificar el tiempo en que se produce la aparición del pelo y la longitud del FP. Las telogenes se suceden a diferentes tiempos después del nacimiento. Tal como se describe en la Introducción, la primera telogén se produce a los 20 días post-nacimiento (P20), la segunda comienza a los 50 días (P50) (telogén refractaria), y la tercera a los 90 días (P90) (telogén competente).

Se llevó a cabo la rasuración de ratones *Snail2*^{-/-}, *Snail2*^{+/-}, y *Snail2*^{+/+} en las tres fases de telogén descritas (Figura 11A), y analizamos la respuesta del FP, es decir, el tiempo que tarda en crecer de nuevo el pelo en los diferentes genotipos y telogenes. Los datos obtenidos muestran que los ratones *Snail2*^{-/-} rasurados a P20 o P50 presentan una iniciación en la aparición del pelo más rápida que en los otros dos genotipos (Figura 11B). Un 33% de los ratones *Snail2*^{-/-} rasurados a P20 presentan, a día 6 post-rasurado (p.r.), un crecimiento visible de pelo, aumentando hasta el 83% a día 10 p.r., y completando el 100% a día 14 p.r. Por el contrario, los ratones *Snail2*^{+/+} no inician el crecimiento de pelo hasta el día 9 p.r. (17%), aumentando progresivamente a partir del día 11 p.r. (62%) hasta alcanzar el 100% de crecimiento a partir del día 13 p.r. Por su parte, los ratones *Snail2*^{+/-} presentan un fenotipo intermedio al inicio (día 8-10 p.r.), para luego igualarse con el crecimiento observado en los ratones *Snail2*^{+/+} (Figura 11B). Un efecto muy similar se

observa en el estudio de la segunda telogén (P50) en los ratones *Snail2*^{-/-} donde a día 6 p.r., un 33% de los ratones muestran pelo en la zona rasurada, y a día 12 este porcentaje se eleva al 83% (Figura 11B). Sin embargo, los ratones *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{+/+} no inician el crecimiento de pelo a estos tiempos (Figura 11B), comportándose de forma estándar en la telogén refractaria; es decir, ante el estímulo de la rasuración no se produce la entrada en anagén, y sólo un porcentaje que no supera el 40% empezó a mostrar pelo en el dorso rasurado entre 19-20 días p.r., y al término de las observaciones (día 26 p.r.), un 40% de los ratones de ambos genotipos no presentó crecimiento del pelo (Figura 11B), de acuerdo con observaciones previas (Muller-Rover et al., 2001). En la tercera telogén (P90) no se observaron diferencias entre los diferentes genotipos, sugiriendo que la telogén competente no se ve afectada por la pérdida de expresión de *Snail2* (Figura 11B).

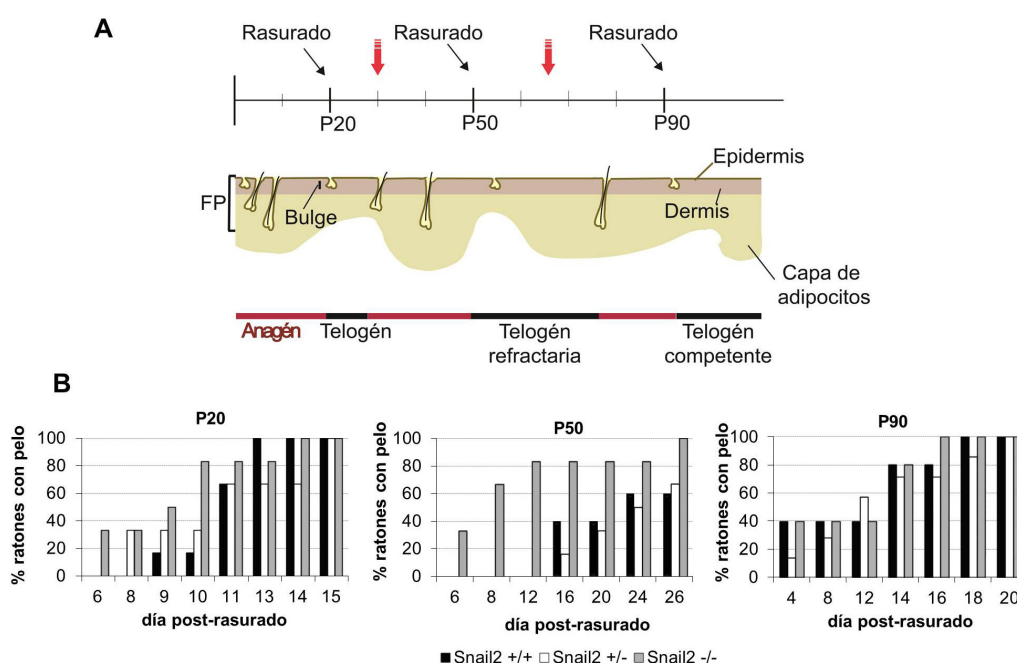


Figura 11. Influencia de *Snail2* en la telogén. (A) Esquema que representa los diferentes tiempos en los que se producen las fases del crecimiento del pelo, indicando con flechas negras el tiempo al que se realiza el rasurado, y con flechas rojas los tiempos a los que se sacrifica a los ratones. (B) Gráficas representando el porcentaje de ratones *Snail2*^{+/+}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-} con pelo visible después de haber sido rasurados a P20 (primera telogén), P50 (segunda telogén, refractaria) o P90 (tercera telogén, competente).

Una vez identificadas las telogenes afectadas por la delección constitutiva de *Snail2* decidimos estudiar, a nivel histológico, el desarrollo del FP en esas etapas. Para tal fin, ratones de los diferentes genotipos *Snail2* se sometieron de nuevo a experimentos de rasuración a P20 y P50, sacrificándose a los tiempos donde se observaron diferencias claras entre los genotipos: 10 días p.r. en la primera telogén, y 16 días p.r. en la segunda telogén, respectivamente (Figura 11A, flechas rojas). Se analizó la longitud de los FPs en secciones de pieles teñidas con hematoxilina-eosina de los diferentes genotipos en aquellos ratones que presentaban pelo. Se observó un

aumento en la longitud del FP en los ratones *Snail2*^{-/-} (media de 1 mm en la primera telogén y 0,7 mm en la segunda telogén) comparado con los ratones *Snail2*^{+/+} (media de 0,35 mm en la primera telogén y 0,4 mm en la segunda telogén), mientras que los FPs de los heterocigotos presentaban una longitud similar a la de los FPs de ratones nulos de *Snail2* (media 0,8 mm en la primera telogén y 0,6 mm en la segunda telogén) (Figura 12A y B).

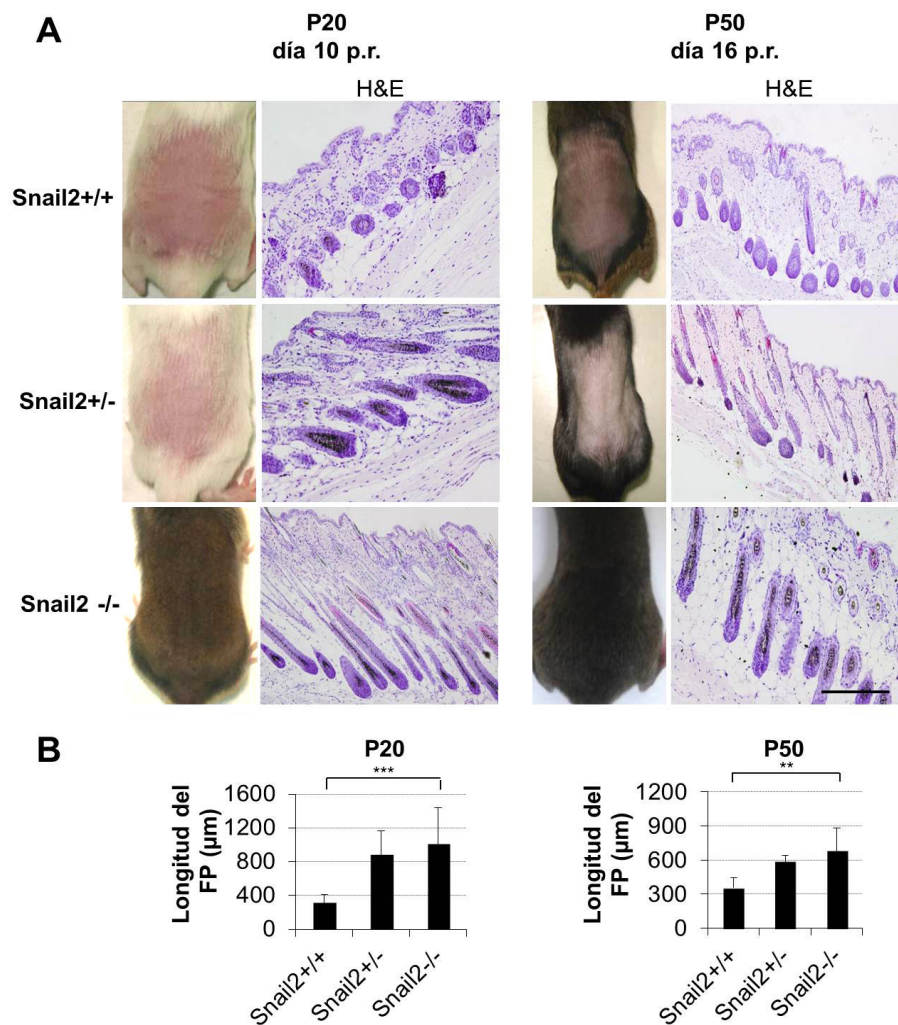


Figura 12. Análisis de la medida de la longitud del folículo piloso en telogén. (A) Fotos del dorso de los ratones *Snail2*^{+/+}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-} rasurados en la primera y segunda telogén a día 10 y 16 p.r. (paneles de la izquierda) y fotos de la tinción con H&E de secciones en las que se aprecia las diferentes longitudes de los FPs (paneles H&E). Escala: 300 μm. **(B)** Cuantificación de la medida de la longitud del FP a día 10 p.r. en la primera telogén (izquierda), o a día 16 p.r. de la segunda telogén (derecha). **p<0,005; ***p<0,001.

Estos resultados indican que la ausencia de *Snail2* modifica significativamente tanto el tiempo de inducción del crecimiento como la longitud del FP en la primera telogén y telogén refractaria sin alterar a la telogén competente.

1.1.2. Alteraciones moleculares en ausencia de Snail2 en la telogén refractaria.

Una vez observadas las diferencias que tenían lugar en la telogén refractaria causadas por la ausencia de Snail2, nos propusimos estudiar en más en detalle las vías de señalización que se encuentran alteradas.

Tal como se ha descrito en la Introducción, una vía de señalización esencial para el desarrollo del FP es la de Wnt/ β -catenina (Millar, 2002; Blanpain and Fuchs, 2006; Fuchs and Horsley, 2008; Choi et al., 2013; Deschene et al., 2014; Lien et al., 2014). Para estudiar el estado de esta vía durante el ciclo del FP en función de la presencia/ausencia de Snail2, se procedió a analizar la expresión y localización de β -catenina en secciones de OCT de las pieles de ratones de los diferentes genotipos. Las pieles fueron recogidas a día 10 y 16 p.r. de la primera (P20) o segunda telogén (P50), respectivamente (Figura 11A). Los datos obtenidos mostraron un aumento de la expresión de β -catenina en los FPs de los ratones *Snail2*^{-/-}, mostrando en algunas regiones una localización en membrana, así como en citoplasma y núcleo (Figura 13A, c, d, g, h). Estos datos están de acuerdo con estudios previos en los que el incremento de β -catenina se ha asociado al estadio de anagén expresándose en la matriz, papila dérmica y la raíz del FP (DasGupta and Fuchs, 1999; Maretto et al., 2003; Choi et al., 2013). Por el contrario, los niveles y localización de β -catenina en los FPs de los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/-} permanecieron inalterados. Estos datos sugieren que Snail2 tiene un papel en el ciclo del FP a nivel de la vía de Wnt/ β -catenina.

A continuación, debido a las alteraciones encontradas, estudiamos la expresión de genes involucrados en el ciclo del FP y la diferenciación de queratinocitos mediante el análisis de los niveles de mRNA en las pieles recogidas de ratones *Snail2* nulos y silvestres a día 10 y 16 p.r. en la primera y segunda telogén, respectivamente. Se analizó la expresión de genes de la vía Notch (*Jagged1*), implicada en diferenciación (Lefort and Dotto, 2004; Watt et al., 2008), así como marcadores de proliferación (*c-jun* y *Ciclina D1*) (Rodríguez-Puebla et al., 1999; Szabowski et al., 2000; Chen et al., 2001) y de células progenitoras (*Aldh1a3* y *K15*) (Liu et al., 2003; Douville et al., 2009) en el FP. Los resultados obtenidos indicaron que las pieles de los ratones *Snail2*^{-/-} rasurados en la primera telogén (P20) mostraron un aumento de expresión de *c-jun*, *ciclina D1* y *Jagged1*, y un descenso significativo de *Aldh1a3* y no significativo en el caso de *K15* comparado con los ratones *Snail2*^{+/+} (Figura 13B, panel superior). El estudio de los ratones rasurados en la telogén refractaria (P50) indicó que las pieles de los ratones *Snail2*^{-/-} presentaban mayores niveles de expresión de *Jagged1* y *ciclina D1* que las de los ratones *Snail2*^{+/+}, no observando diferencias significativas en la expresión de *c-jun* ni *Aldh1a3*, y una ligera disminución de *K15* (Figura 13B, panel inferior).

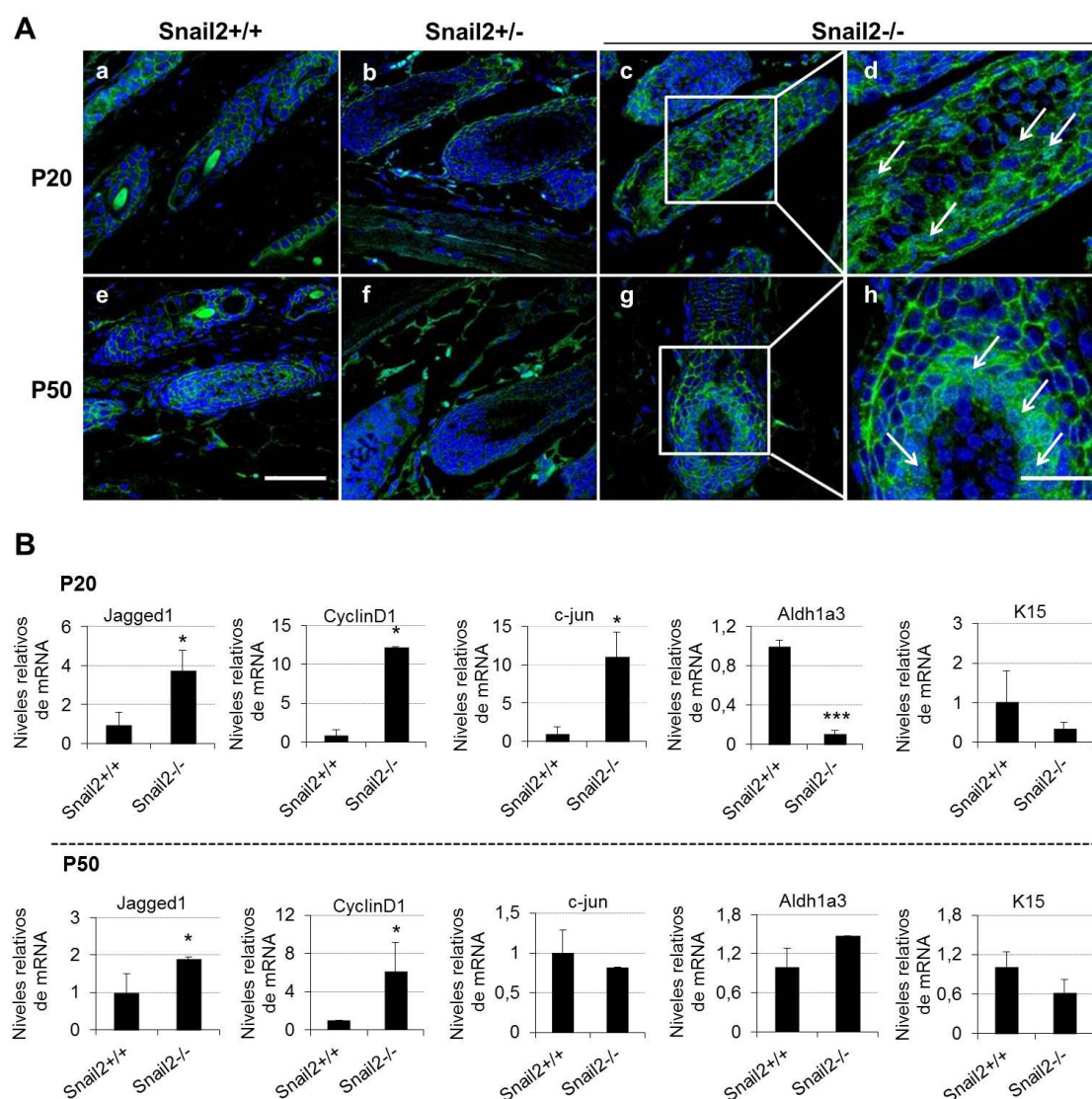


Figura 13. Caracterización de las alteraciones del FP en la primera y segunda telogén en ratones *Snail2*^{-/-}. (A) Inmunofluorescencia de β-catenina en secciones de pieles del dorso a día 10 y 16 p.r. de los ratones *Snail2*^{-/-}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{+/+} rasurados en la primera (a-d) y segunda telogén (e-h), respectivamente. Los núcleos están teñidos con DAPI. Las flechas apuntan a ejemplos de células con localización nuclear de β-catenina. Escala: 50 μm. (B) Cuantificación de mRNA de los genes indicados en las muestras de pieles rasuradas de ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-} en la primera telogén y recogidas a día 10 p.r. (panel superior), y en la segunda telogén y recogidas a día 16 p.r. (panel inferior). *p<0,05; ***p<0,001.

Todos estos datos sugieren que la ausencia de *Snail2* produce una alteración en la primera telogén y en la telogén refractaria, con un aumento de la proliferación tras un estímulo como la rasuración. Debido a que la localización nuclear de β-catenina se ha asociado a células progenitoras del FP, los resultados apuntan a que las alteraciones observadas en la expresión de β-catenina y marcadores de proliferación y/o de células progenitoras se deben a la ausencia de *Snail2* y su posible acción sobre la movilización de células madre progenitoras de la región prominente.

1.2. Respuesta a la carcinogénesis química en función de la presencia y dosis génica de *Snail2*.

Estudios previos del laboratorio habían caracterizado la respuesta al tratamiento por DMBA/TPA de los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-}, observándose que los ratones *Snail2*^{-/-} desarrollaban un mayor número de lesiones, de mayor tamaño y mayor grado de malignización que las generadas en los ratones *Snail2*^{+/+} (Molina-Ortiz, P., 2010). Sin embargo, en este estudio no se había analizado el comportamiento de los ratones *Snail2*^{+/-}. Por este motivo decidimos estudiar la respuesta a la iniciación y progresión tumoral en función de la dosis de *Snail2* aplicando el protocolo de DMBA/TPA a ratones *Snail2*^{+/-} en paralelo con ratones *Snail2*^{+/+}. El análisis de estos datos, junto a los obtenidos en el estudio previo, mostró que los ratones *Snail2*^{+/-} presentaban una incidencia tumoral del 100%, al igual que en los otros dos genotipos, pero exhibían una latencia mayor, apareciendo las primeras lesiones a partir de las 10 semanas post-iniciación y alcanzando el 100% de incidencia a las 13-14 semanas, mientras que en los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-} se iniciaban las lesiones a partir de la semana 8 y alcanzaban el 100% de incidencia en la semana 11, (Figura 14A). Asimismo, observamos que la carga tumoral de los ratones *Snail2*^{+/-} era menor que en los otros genotipos, alcanzando, en la semana 20, 4-5 lesiones/ratón mientras que en los ratones *Snail2*^{+/+} era de 10 lesiones/ratón y en los ratones *Snail2*^{-/-} de 20 lesiones/ratón (Figura 14B). En cuanto al tamaño de las lesiones, los ratones *Snail2*^{+/-} presentaban globalmente lesiones de un tamaño menor que las lesiones que presentaban los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-} (Figura 14C). Significativamente, las lesiones de los ratones *Snail2*^{-/-} mostraron un crecimiento bifásico en la carga tumoral respecto a los otros dos genotipos, con un llamativo aumento en el número de lesiones a partir de la semana 13 (Figura 4B). En cuanto al tamaño de las lesiones, en las primeras semanas el crecimiento de las pertenecientes a ratones *Snail2*^{-/-} era similar al de las lesiones de los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/-}, pero a partir de la semana 16 experimentaron una tasa de crecimiento significativamente superior (Figura 14C).

El análisis histopatológico de las lesiones generadas en los ratones de los 3 genotipos *Snail2* mostró que los ratones *Snail2*^{+/-} presentaban un 96% de papilomas (de los cuales un 16% presentaban áreas de desdiferenciación), y un 4% eran carcinomas de células escamosas (SCC) (Figura 14D). En los ratones *Snail2*^{+/+} se observó un 8% de SCC mientras que los ratones *Snail2*^{-/-} mostraron un claro incremento, con un 33% de lesiones clasificadas como SCC (Figura 14D), indicando que la ausencia de *Snail2* promueve la progresión de papiloma a SCC.

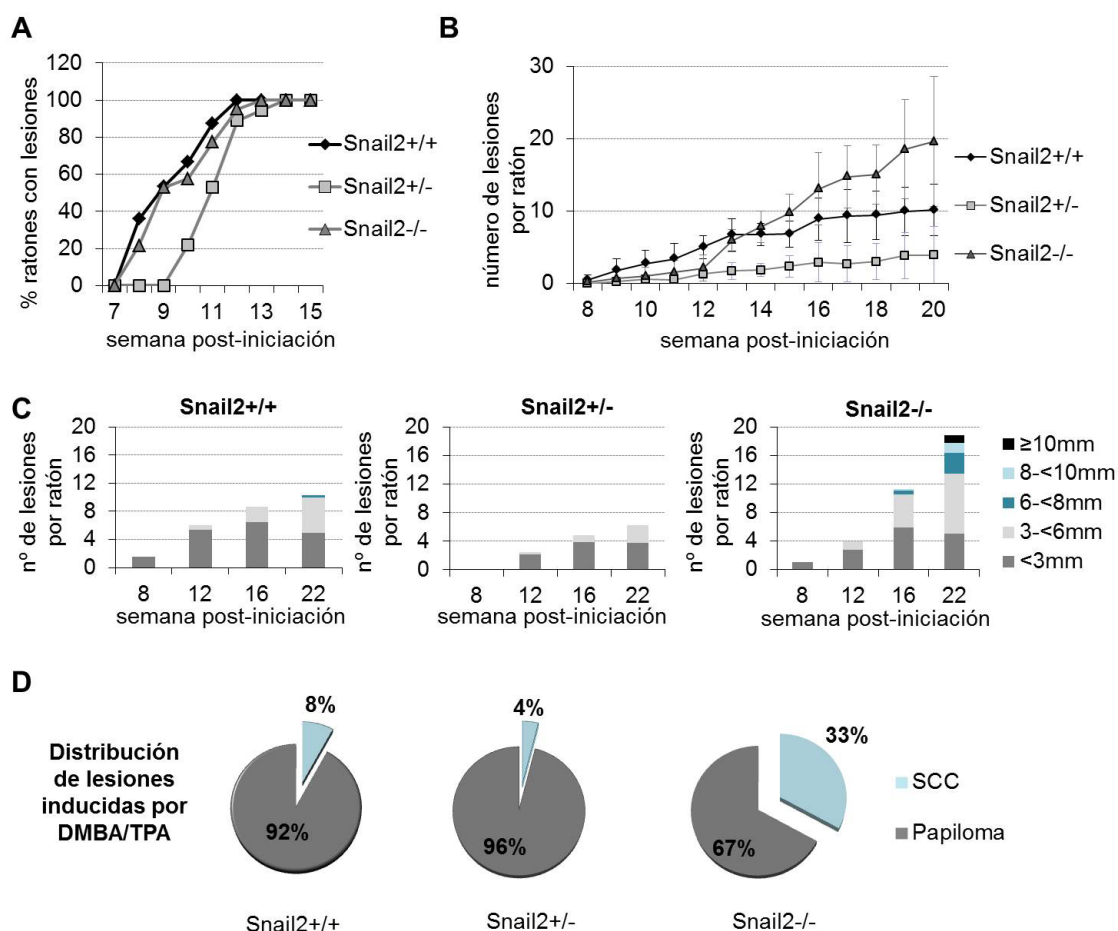


Figura 14. Influencia de *Snail2* en carcinogénesis de piel de ratón. (A) Gráfica de incidencia. Se representa el porcentaje de ratones *Snail2*^{+/+}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-} que han desarrollado alguna lesión durante el tratamiento con DMBA/TPA. (B) Gráfica de carga tumoral. Se representa la media del número de lesiones por ratón para *Snail2*^{+/+} (n= 13), *Snail2*^{+/-} (n=10) y *Snail2*^{-/-} (n= 13). Los ratones *Snail2*^{-/-} son los que desarrollan menos lesiones a lo largo del tiempo. (C) Tamaño tumoral representado como el número medio de lesiones por ratón con los diámetros indicados a los diferentes tiempos post-iniciación para los tres genotipos. (D) Distribución de las lesiones en porcentaje inducidas por DMBA/TPA clasificadas como SCC y papilomas en ratones *Snail2*^{+/+}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-}. Los datos de los ratones *Snail2*^{-/-} provienen de estudios previos (Molina-Ortiz, P, 2010).

1.2.1. Análisis molecular de las lesiones generadas en la carcinogénesis química.

Con el fin de profundizar en el estudio de la progresión tumoral de las lesiones generadas en función de la presencia y dosis de *Snail2*, se procedió a analizar por inmunohistoquímica el perfil de expresión de marcadores de diferenciación epidérmica (loricrina, CK10, CK13 y CK8) en papilomas y SCC de los ratones de los tres genotipos *Snail2*. Este estudio mostró que la loricrina (marcador de diferenciación terminal) (Hohl et al., 1993), se restringía al estrato cornificado en los papilomas de los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/-} (Figura 15A, a y b), mientras que en los papilomas de los ratones *Snail2*^{-/-} se expresaba en otros estratos suprabasales (Figura 15A, c), sugiriendo que el proceso de

diferenciación terminal estaba alterado. Este resultado estaría en consonancia con la alteración de la diferenciación terminal observada previamente en pieles de ratones *Snail2*^{-/-} tratadas con TPA (ver Figura 8 de la Introducción). La CK10, un marcador de diferenciación característico de papilomas iniciales (Caulin et al., 1993), se expresa en capas del estrato suprabasal de papilomas y a bajos niveles en SCC de ratones *Snail2*^{+/+} (Figura 15A y B, panel d), mientras que disminuye drásticamente o está ausente en ambos tipos de lesiones de ratones *Snail2*^{+/-} (Figura 15A y B, panel e) y *Snail2*^{-/-} (Figura 15A y B, panel f). La CK13, un marcador de progresión de papilomas (Nischt et al., 1988; Gimenez-Conti et al., 1990), se expresa a altos niveles incluso en papilomas bien diferenciados de ratones *Snail2*^{+/-} (Figura 15A, h) y *Snail2*^{-/-} (Figura 15A, i), en contraste con su casi completa ausencia en papilomas de ratones *Snail2*^{+/+} (Figura 15A, g). Además, se mantienen niveles altos de CK13 en SCC de ratones *Snail2*^{-/-} comparado con SCC de ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/-} (Figura 15B, g-i). Por último, la expresión de CK8, un marcador de progresión de papiloma a SCC (Larcher et al., 1992; Caulin et al., 1993), mostró un patrón similar a la CK13, expresándose en papilomas de ratones *Snail2*^{-/-} y *Snail2*^{+/-} (Figura 15A, k-l), y a mayores niveles en SCC de ratones *Snail2*^{-/-} (Figura 15B, l), mientras que está ausente en lesiones de ratones *Snail2*^{+/+} (Figura 15A y B, panel j). Estos datos indican que los papilomas *Snail2*^{+/-} presentan un patrón de marcadores compatible con una mayor capacidad de progresión que los generados por los ratones *Snail2*^{+/+}, aunque en menor medida que los papilomas originados en los ratones *Snail2*^{-/-}.

Como se ha mencionado previamente, las lesiones generadas en los ratones *Snail2*^{-/-} eran de un tamaño significativamente superior a las desarrolladas por los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/-}. Para determinar la causa de esta diferencia de tamaño, decidimos investigar el estado proliferativo y de muerte celular en dichas lesiones. El análisis del estado proliferativo de las lesiones, mediante IHC del marcador de proliferación ciclina D1, reveló un aumento de ciclina D1 en las lesiones (papilomas y SCC) de los ratones *Snail2*^{-/-} respecto a los ratones de los otros dos genotipos (Figura 16, a-c, d-f), lo que sugiere que la ausencia de *Snail2* promueve la proliferación de las lesiones. Por otro lado, el análisis de muerte celular, mediante la técnica de TUNEL mostró un aumento en los papilomas de ratones *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-} comparado con el de ratones *Snail2*^{+/+} (Figura 16, g-i). Este resultado está en consonancia con datos previos que indicaban que *Snail2* aumenta la supervivencia frente a un daño genotóxico (Inoue et al., 2002; Perez-Losada et al., 2003; Wu et al., 2005), e indica que el aumento de apoptosis no compensa el aumento de proliferación observado en las lesiones de ratones *Snail2*^{-/-} frente a los otros genotipos. Finalmente, debido al papel relevante de β -catenina en la progresión de carcinomas de piel (Conacci-Sorrell et al., 2002; Malanchi et al., 2008), se analizó por inmunofluorescencia e inmunocitoquímica la expresión de β -catenina en las lesiones derivadas de ratones *Snail2* de los tres genotipos. Este estudio mostró

una localización citoplásmica de β -catenina en los papilomas de ratones *Snail2*^{-/-} superior a la observada en los papilomas de los otros dos genotipos (Figura 17, a-d), así como localización nuclear, que estaba ausente en los papilomas de los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/-} (Figura 17, e-h).

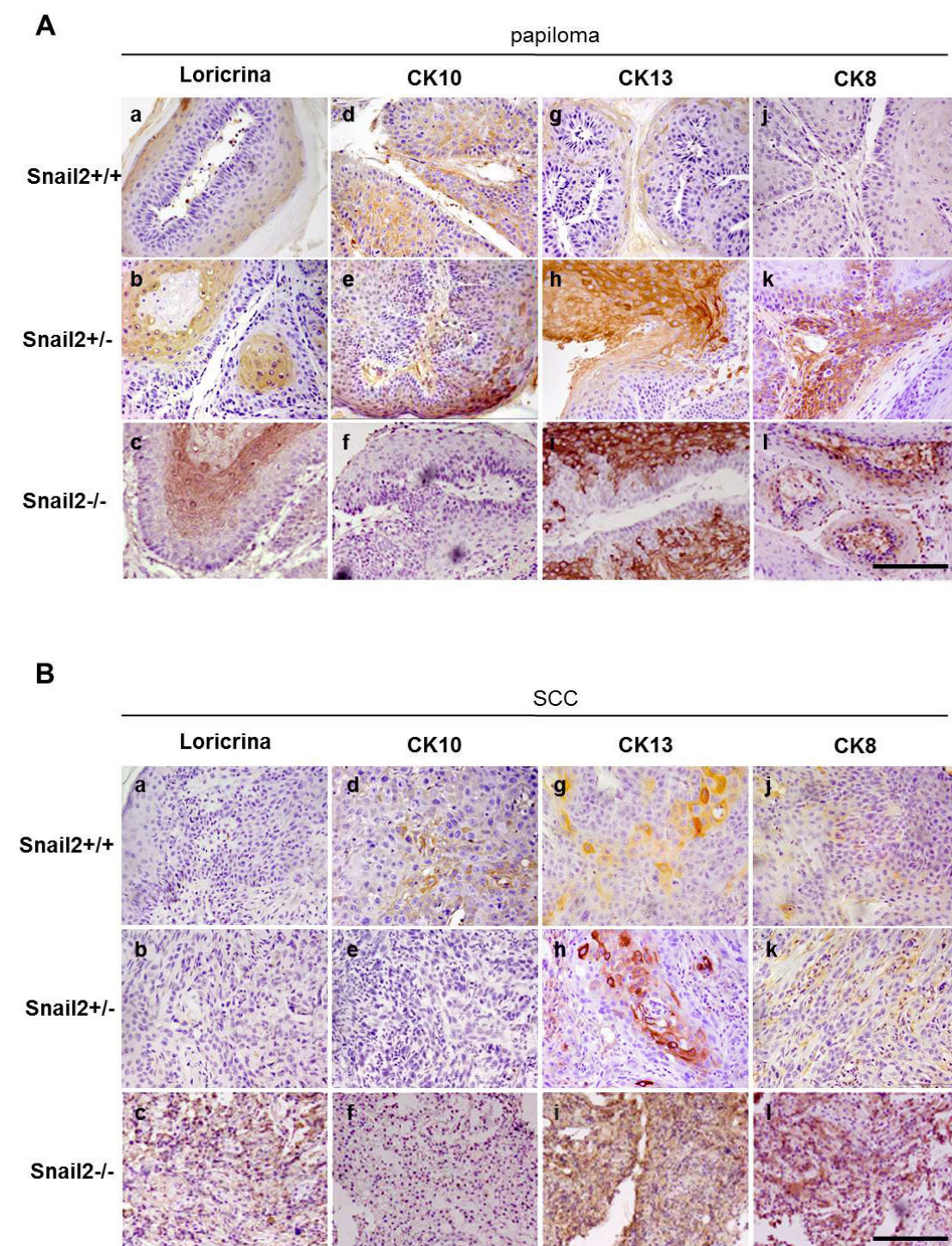


Figura 15. Análisis comparativo de marcadores de diferenciación en lesiones inducidas por DMBA/TPA en ratones de los genotipos *Snail2*. (A) Imágenes representativas de inmunotinciones para loricrina (a-c), CK10 (d-f), CK13 (g-i) y CK8 (j-l) de papilomas de los genotipos *Snail2* indicados. (B) Imágenes representativas de inmunotinciones para loricrina (a-c), CK10 (d-f), CK13 (g-i) y CK8 (j-l) de SCC de los genotipos *Snail2* indicados. Escala: 500 μ m.

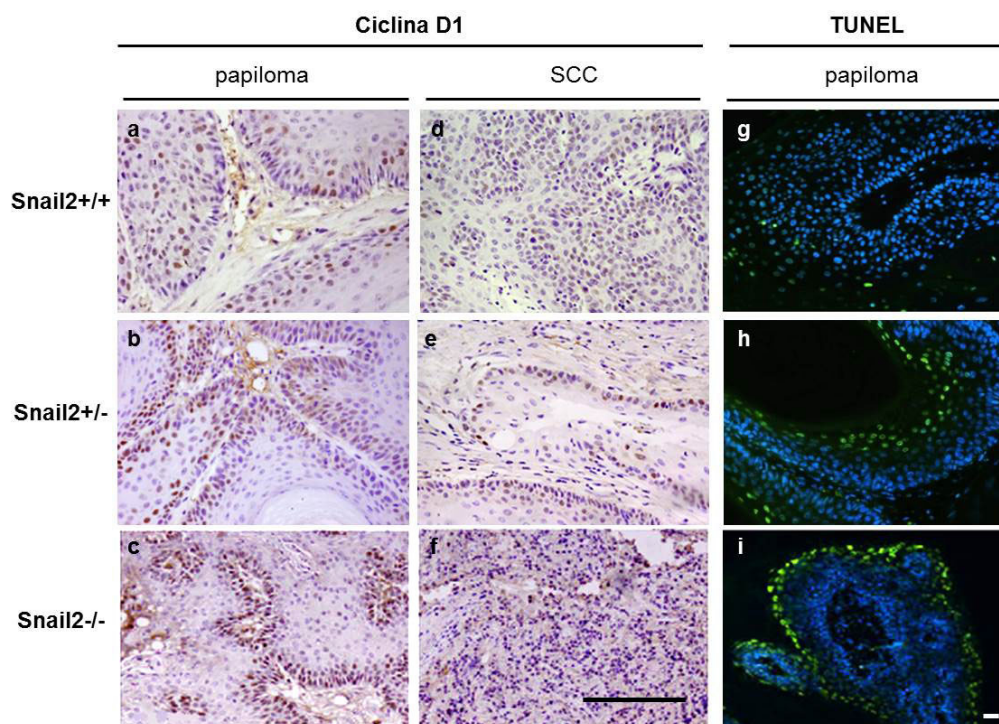


Figura 16. Análisis comparativo de marcadores de proliferación y apoptosis en lesiones inducidas por DMBA/TPA en ratones de los genotipos *Snail2*. Imágenes representativas de inmunotinción para ciclina D1 en papilomas (a-c) y SCC (d-f), y detección del nivel de apoptosis mediante ensayo de TUNEL (g-i) en papilomas de los tres genotipos *Snail2* tratados con DMBA/TPA. IHC, escala: 500 μ m; TUNEL, escala: 100 μ m.

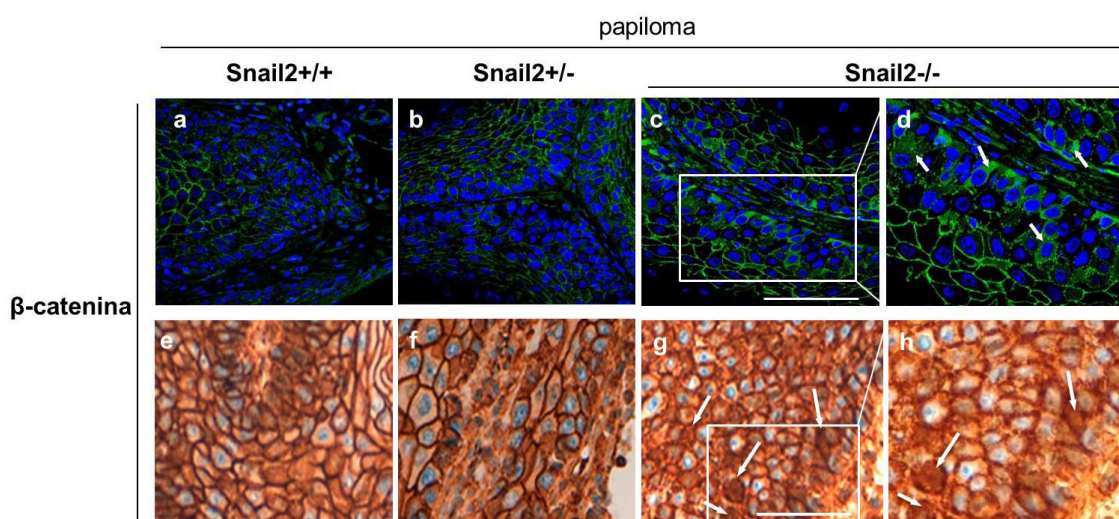


Figura 17. Análisis de la localización de β -catenina en lesiones inducidas por DMBA/TPA en ratones de los genotipos *Snail2*. Imágenes representativas de inmunofluorescencia (a-d) e inmunohistoquímica (e-h) para β -catenina en papilomas de ratones de los genotipos *Snail2* indicados. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las flechas blancas indican localización nuclear o citoplasmática. Las imágenes en d y h son ampliaciones de las regiones indicadas en los recuadros de c y g, respectivamente. Escala: 100 μ m.

En conjunto, estos datos indican que las lesiones pre-malignas (papilomas) de los ratones *Snail2*^{+/-} presentan mayor tendencia a la progresión maligna que las lesiones de los ratones *Snail2*^{+/+}, aunque en menor medida que los ratones *Snail2*^{-/-}, manifestado por el patrón de expresión conjunto de marcadores de diferenciación, sin afectar significativamente a la capacidad de proliferación, a pesar que muestran una mayor tasa de apoptosis que los papilomas de los ratones *Snail2*^{+/+}.

1.3. Análisis del componente inflamatorio en la carcinogénesis química de piel de ratón.

1.3.1. Inflamación y carcinogénesis en el modelo de ratón nulo de *Snail2*.

Resultados previos del laboratorio habían mostrado que la ausencia de *Snail2* inhibía la capacidad clonogénica de los queratinocitos (ver Figura 8 de la Introducción), lo que indica que el comportamiento observado en el protocolo de carcinogénesis química puede deberse a factores extrínsecos a los propios queratinocitos (“non-cell autonomous”). Asimismo, el análisis histopatológico mostró que las lesiones originadas por el tratamiento con DMBA/TPA en los ratones *Snail2*^{-/-} presentaban un elevado porcentaje de células inflamatorias (Molina-Ortiz, P., 2010). En dicho estudio se analizó el efecto anti-inflamatorio de la dexametasona sobre las lesiones generadas por el tratamiento con DMBA/TPA en ratones *Snail2*^{-/-} y *Snail2*^{+/+}. Sorprendentemente, el tratamiento con dexametasona provocó un aumento en el número de lesiones en ratones *Snail2*^{-/-} (Molina-Ortiz, P., 2010), sugiriendo que la ausencia de *Snail2* promueve una alteración del componente inflamatorio que puede estar relacionado con la progresión tumoral observada en los ratones *Snail2*^{-/-}.

Con el objetivo de caracterizar en mayor detalle el efecto de la inflamación en el proceso de carcinogénesis química, procedimos a analizar el tipo de células del sistema hematopoyético presentes en las lesiones tumorales, así como en sangre periférica y médula ósea, de ratones *Snail2*^{+/+}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-} al final de un experimento de carcinogénesis química. En concreto se analizaron las poblaciones mieloides (CD11b⁺/Gr1⁺), linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) y linfocitos B (CD19⁺) en las diferentes muestras mediante citometría de flujo. El análisis de las muestras de sangre y médula ósea de ratones de los tres genotipos *Snail2* recogidas previamente al tratamiento con DMBA/TPA no evidenció alteraciones en las diferentes poblaciones celulares entre los tres genotipos (Figura 18). Por el contrario, se observaron variaciones importantes en las distintas poblaciones analizadas de los ratones tratados con DMBA/TPA entre los diferentes genotipos (Figura 19). Tanto las muestras tumorales, como las de sangre periférica y médula ósea derivadas de los ratones *Snail2*^{-/-}, presentaron un aumento significativo en la población de precursores

mieloides CD11b⁺/Gr1⁺, respecto a las muestras derivadas de los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/-} (Figura 19A). Adicionalmente, el análisis de las poblaciones de linfocitos T y B en los tumores mostró un aumento en la población de linfocitos T CD8⁺ y linfocitos B CD19⁺ en las lesiones de los ratones *Snail2*^{-/-} comparado con las de los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/-} (Figura 19B), aunque en ambos casos las diferencias no alcanzaron significación estadística.

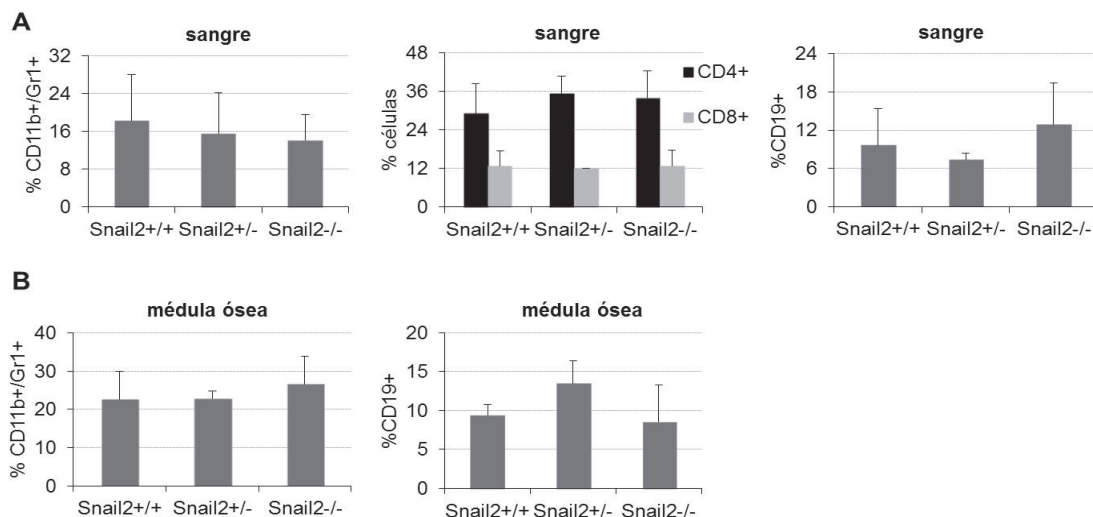


Figura 18. Análisis por citometría de flujo de marcadores de inflamación en ratones *Snail2* sin tratar. (A) Datos de citometría de flujo para las poblaciones CD11b⁺/Gr1⁺ (izquierda), CD4⁺ y CD8⁺ (centro) y CD19⁺ (derecha) en muestras de sangre periférica. **(B)** Datos de citometría de flujo de las poblaciones CD11b⁺/Gr1⁺ (izquierda) y CD19⁺ (derecha) en muestras de médula ósea. En ambos casos los datos de las gráficas corresponden a ratones *Snail2*^{+/+} (n=3), *Snail2*^{+/-} (n=3) y *Snail2*^{-/-} (n=3) sin ser sometidos a ningún tipo de tratamiento de carcinogénesis y de una edad similar a los ratones tratados con DMBA/TPA al final del experimento.

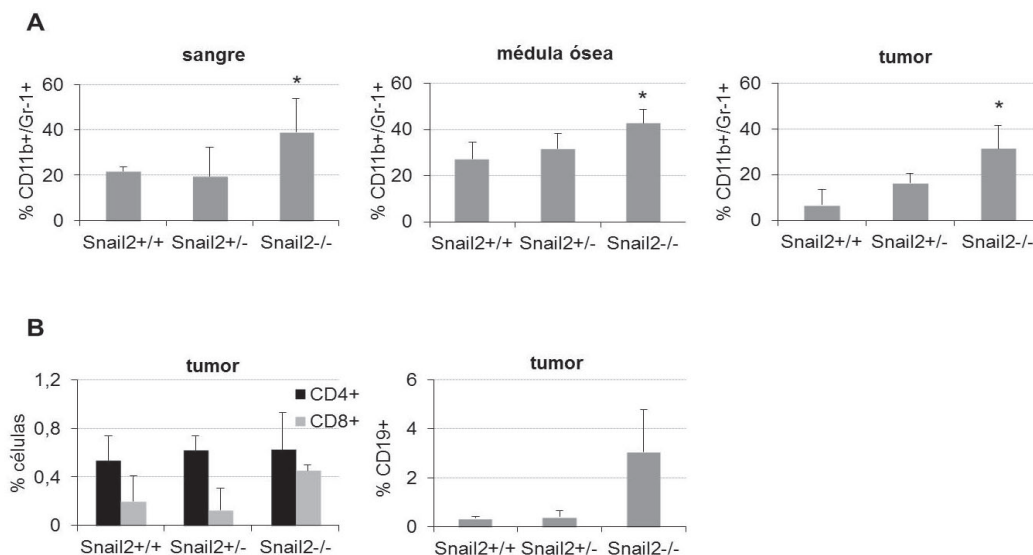


Figura 19. Análisis por citometría de flujo de marcadores de inflamación tras la carcinogénesis química. (A) Datos de citometría de flujo para CD11b⁺/Gr1⁺ en muestras de sangre periférica (izquierda), médula ósea (centro) y lesiones tumorales (derecha). **(B)** Datos de citometría de flujo para CD4⁺ y CD8⁺ (izquierda), y CD19⁺ (derecha) en lesiones tumorales. Los datos corresponden al análisis de las muestras obtenidas de ratones *Snail2*^{+/+} (n=6), *Snail2*^{+/-} (n=6) y *Snail2*^{-/-} (n=6) tratados con DMBA/TPA durante 16 semanas. *p<0,05.

Estos resultados indican que la ausencia de *Snail2* promueve una alteración en la respuesta inflamatoria tras el tratamiento con DMBA/TPA, caracterizada sobre todo por un aumento de la población de precursores mieloides.

1.3.2. Influencia de la ausencia de *Snail2* en el componente hematopoyético en el contexto de la carcinogénesis química.

Debido al papel descrito de *Snail2* en la homeostasis y respuesta a radiación del sistema hematopoyético (Inoue et al., 2002; Perez-Losada et al., 2002; Perez-Losada et al., 2003; Wu et al., 2005), junto a la presencia de un componente inflamatorio anómalo en los ratones *Snail2*^{-/-} tras la inducción de carcinogénesis química, y a las observaciones previas del laboratorio que mostraban la incapacidad proliferativa de los queratinocitos *Snail2*^{-/-}, decidimos profundizar en la influencia de la delección constitutiva de *Snail2* en el componente hematopoyético y su implicación en el proceso tumoral. Para ello se llevaron a cabo experimentos de trasplante de médula ósea proveniente de los diferentes genotipos *Snail2* en ratones *Snail2*^{-/-} y *Snail2*^{+/+} previo al tratamiento con DMBA/TPA. Nuestra hipótesis era que el mayor crecimiento y malignización de las lesiones en los ratones *Snail2*^{-/-} se podría deber a factores extrínsecos a las células tumorales presentes en el estroma tumoral y que favorecieran la progresión tumoral.

En primer lugar, llevamos a cabo el trasplante de médula ósea procedente de ratones *Snail2*^{-/-} y *Snail2*^{+/+} (control) a ratones *Snail2*^{+/+}, para determinar los efectos de la delección constitutiva de *Snail2* en el sistema hematopoyético sobre el desarrollo de las lesiones inducidas por DMBA/TPA, en un contexto genético en el que *Snail2* está presente en la piel, al igual que en otros tejidos adyacentes. Tras realizar el trasplante, y permitir la reconstitución de la médula ósea durante un mes, se realizó el genotipado de *Snail2* y *LacZ* (indicativo del alelo *Snail2*^{-/-}) en una muestra de sangre periférica para comprobar que el trasplante había sido efectivo y que no habían quedado células de la médula del hospedador (Figura 20A, B). Tras estas comprobaciones se inició el tratamiento con DMBA/TPA, analizando la incidencia, latencia, carga tumoral y el tamaño de las lesiones (Figura 20C y D).

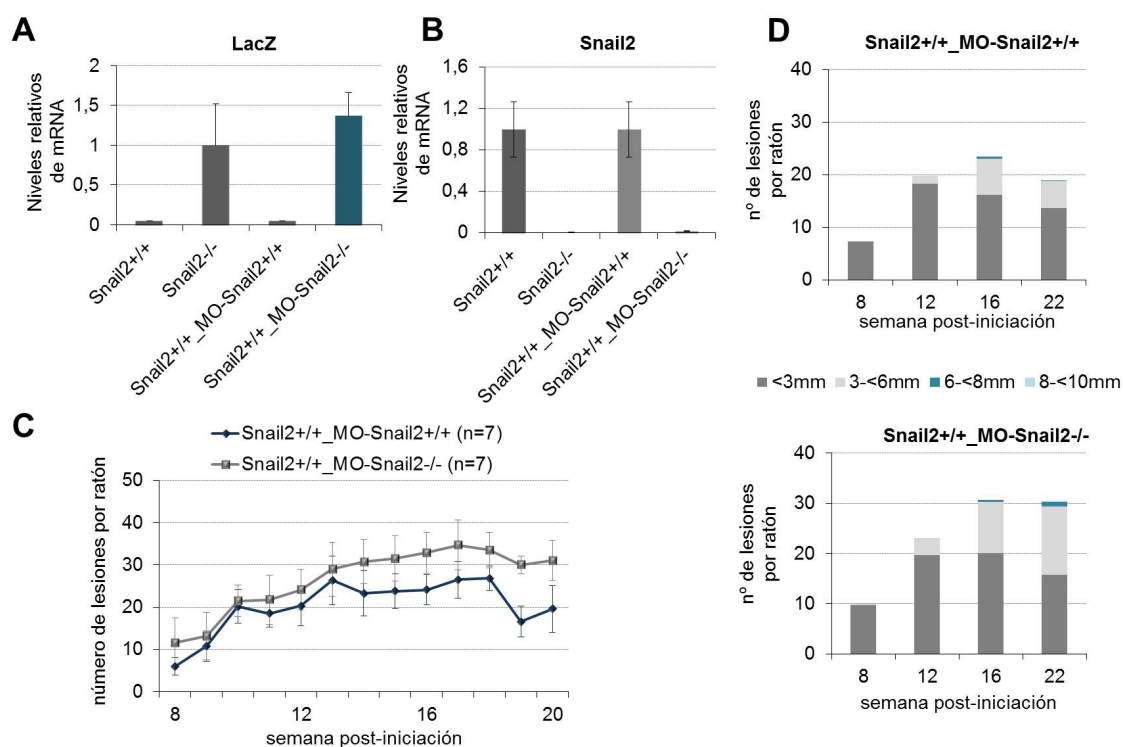


Figura 20. Efecto de la ausencia de Snail2 en el sistema hematopoyético en el desarrollo de lesiones por DMBA/TPA. (A) y (B) Expresión de los niveles de *LacZ* (A) y *Snail2* (B) en muestras de sangre tras realizar el trasplante de médula ósea. Utilizamos como control muestras de sangre de ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-} para relativizar los niveles obtenidos en los ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-}. (C) Gráfica de la carga tumoral. Se observan las diferencias en el número de lesiones/ratón entre los ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-} a lo largo del tratamiento de carcinogénesis. (D) Tamaño de las lesiones desarrolladas por los grupos experimentales y a los tiempos indicados representado como la media del número de lesiones con los diámetros indicados a diferentes tiempos post-iniciación.

Respecto a la latencia tumoral, tanto los ratones *Snail2*^{+/+} trasplantados con médula ósea procedente de ratones *Snail2*^{+/+} (*Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+}) como los trasplantados con médula ósea procedente de ratones *Snail2*^{-/-} (*Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-}) empezaron a desarrollar tumores, alcanzando el 100% de incidencia a la semana 8 post-iniciación (datos no mostrados). En cuanto a la carga tumoral se observó una primera fase en la que no se apreciaron diferencias entre los dos grupos de ratones, pero a partir de la semana 13 post-iniciación, los ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-} desarrollaron un mayor número de lesiones que los *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+}, que se mantiene hasta el final del tratamiento (Figura 20C y Figura 21A, c y f), de forma similar a lo que ocurría entre los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-} (ver Figura 14B). Asimismo, el tamaño de las lesiones inducidas en los ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-} fue mayor a lo largo del experimento comparado con el tamaño de las procedentes de ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+} (Figura 20D y Figura 21A, c y f). En cuanto al análisis histopatológico de las lesiones, los ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-} desarrollaron un mayor porcentaje de SCC que los ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+} (12% vs 6%), con la correspondiente

disminución en el porcentaje de papilomas (88% vs 94%) (Figura 21B).

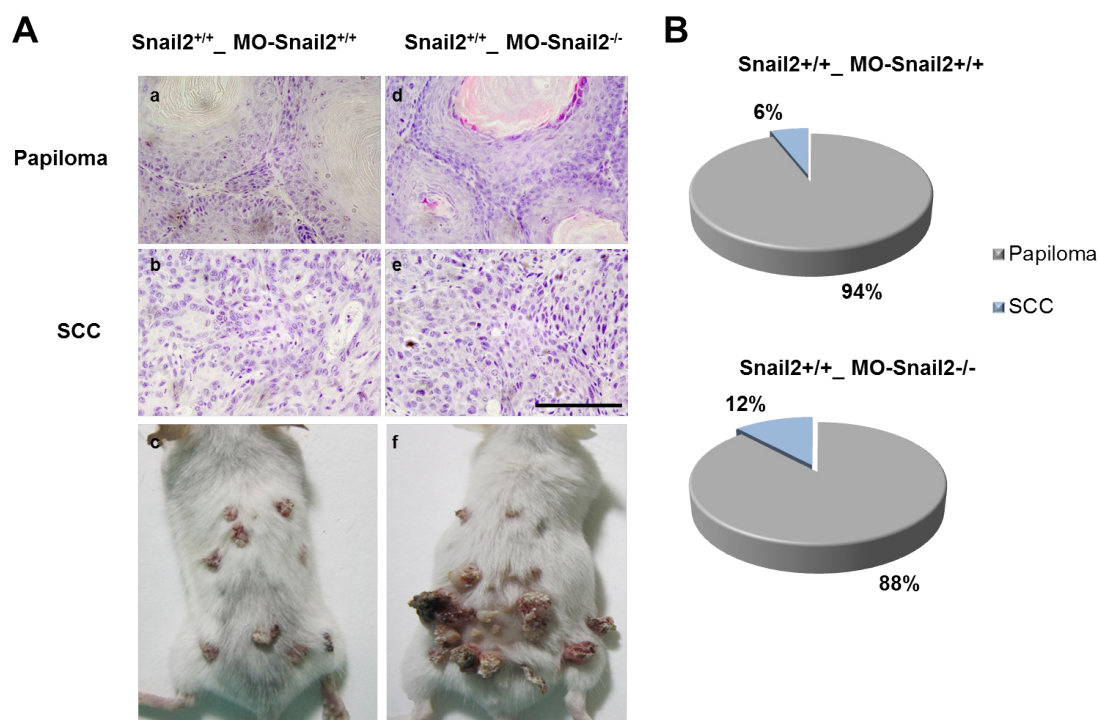


Figura 21. Análisis histopatológico de las lesiones inducidas por DMBA/TPA en ausencia de *Snail2* en el sistema hematopoyético. (A) Imágenes representativas de las tinciones con H&E de papilomas y SCC de ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+} (a y b) y *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-} (d y e) y fotos del dorso de los ratones al final del experimento (c y f). Escala: 500 μ m. **(B)** Distribución de lesiones (en porcentaje) inducidas por DMBA/TPA, clasificadas como papilomas y SCC en ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-}.

El análisis del marcador de proliferación ciclina D1 en papilomas no mostró diferencias aparentes entre las lesiones derivadas de ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-}, y tampoco se encontraron diferencias significativas en el nivel de apoptosis entre ambos tipos de lesiones (Figura 22, a y b; c y d, respectivamente). Sin embargo, cuando se analizó la expresión de marcadores de diferenciación terminal (loricrina) y suprabasal (CK10), se observó que en los papilomas de los ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-}, la expresión de ambos marcadores era significativamente menor respecto a las lesiones de los ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+} (Figura 22, c-f). Adicionalmente, el análisis de la expresión de β -catenina mostró un incremento en papilomas derivados de ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-}, respecto a las lesiones de ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+} (Figura 22, i y j), al igual que lo observado previamente en las lesiones de ratones *Snail2*^{-/-} respecto a los controles *Snail2*^{+/+} (ver Figura 17). En conjunto, estos datos indican que los ratones *Snail2*^{+/+} trasplantados con médula ósea de ratones *Snail2*^{-/-} reproducen el comportamiento de los ratones *Snail2*^{-/-}, a excepción del patrón de expresión de loricrina, en la respuesta a carcinogénesis inducida por DMBA/TPA.

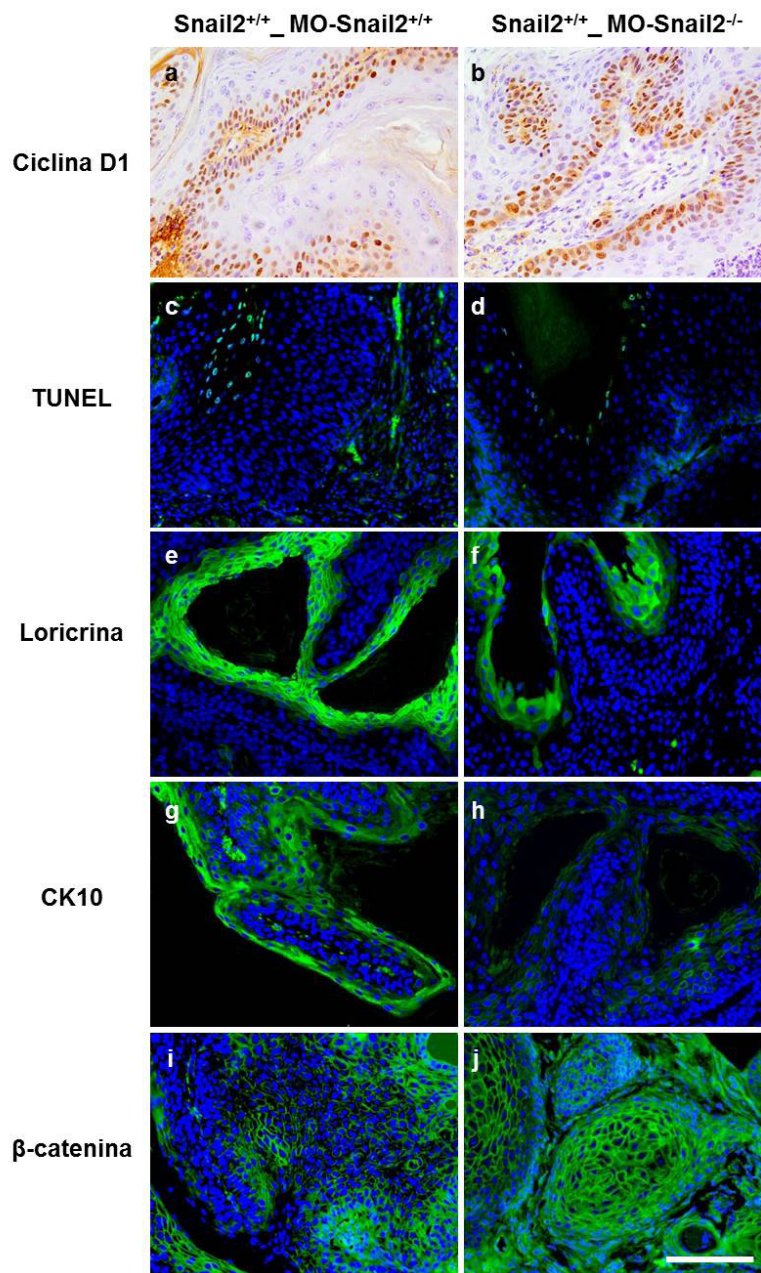


Figura 22. Efecto de la delección constitutiva de *Snail2* en el sistema hematopoyético en diferenciación, proliferación y apoptosis en lesiones de carcinogénesis química en piel. Imágenes representativas de inmunohistoquímica para ciclina D1 (a, b), ensayo de TUNEL (c, d), e inmunofluorescencias para loricrina (e, f), CK10 (g, h), y β -catenina (i, j), y (g, h) en papilomas de ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-} generados por el tratamiento con DMBA/TPA. Escala: 500 μ m.

Para confirmar que el fenotipo observado era debido a la carencia de *Snail2* en la médula ósea, se procedió a realizar un experimento de reconstitución de médula ósea complementario. Así, ratones con fondo genético *Snail2*^{-/-} se trasplantaron con médula ósea procedente de ratones *Snail2*^{+/+}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-}. Debido a la radiosensibilidad de los ratones *Snail2*^{-/-} (Inoue et al., 2002; Perez-Losada et al., 2003), éstos se irradiaron a una dosis sub-lethal. Al igual que en los experimentos anteriores, tras permitir la reconstitución de la médula ósea, se genotipó *Snail2*

y *LacZ* en una muestra de sangre periférica de cada uno de los tres grupos experimentales para comprobar la eficiencia de la repoblación por los donantes (Figura 23A, B) y se inició el tratamiento con DMBA/TPA. Como en los casos anteriores, analizamos la latencia, incidencia, carga tumoral y el tamaño de las lesiones (Figura 23C-E). Los datos de latencia e incidencia mostraron que los ratones trasplantados con médula ósea procedente de ratones *Snail2*^{+/-} (*Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/-}) presentan una mayor latencia y un retraso en alcanzar el 100% de incidencia, mientras que los ratones trasplantados con médula ósea de ratones *Snail2*^{-/-} (*Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{-/-}) mostraron una latencia intermedia e incidencia similar a los ratones trasplantados con médula ósea de ratones *Snail2*^{+/-} (*Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/-}) (Figura 23C). En cuanto a la carga tumoral, los resultados mostraron que los ratones *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{-/-} son los que desarrollan un mayor número de lesiones y de mayor tamaño al final del experimento comparado con los otros dos grupos de ratones (Figura 23D y E), reproduciendo el comportamiento de los ratones *Snail2*^{-/-}.

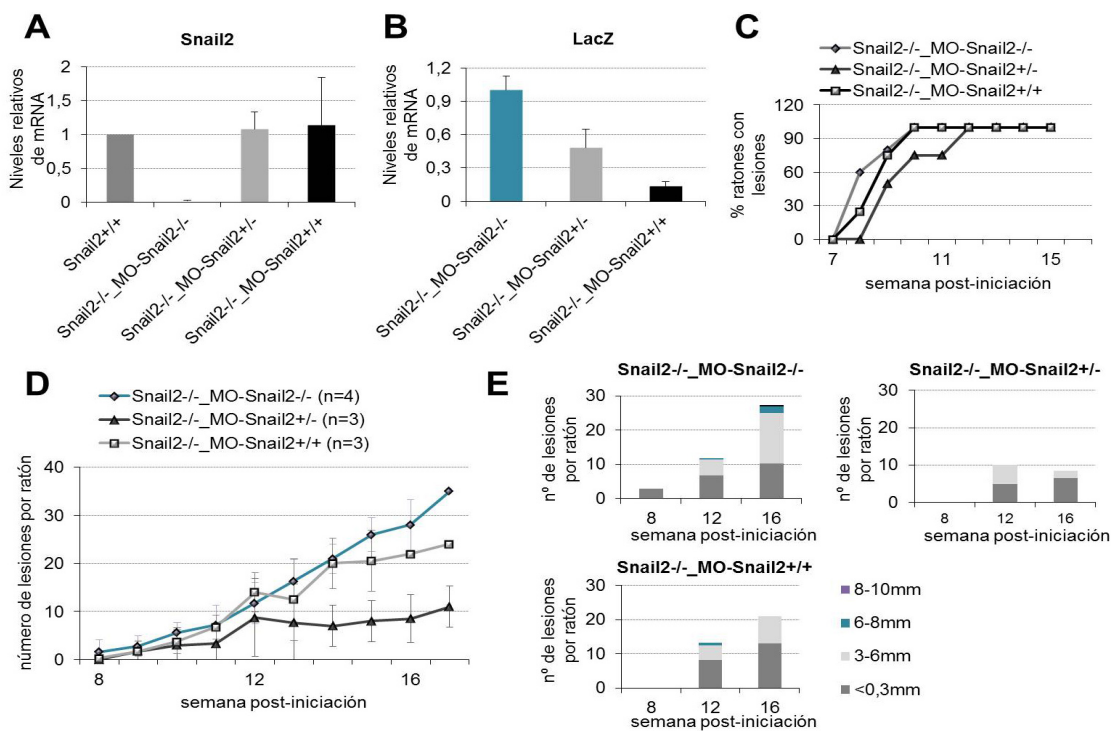


Figura 23. Efecto de la reconstitución de médula ósea de ratones *Snail2*^{-/-} en la carcinogénesis química. (A) y (B) Expresión de los niveles de *Snail2* (A) y *LacZ* (B) en muestras de sangre periférica tras realizar el trasplante de médula ósea proveniente de ratones *Snail2*^{+/-}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-} a ratones *Snail2*^{-/-}. (C) Gráfica de incidencia de los ratones *Snail2*^{-/-} reconstituidos (*Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{-/-}, *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/-}) durante el protocolo de DMBA/TPA. (D) Gráfica de carga tumoral que indica el número medio de lesiones tumorales por ratón en cada uno de los tres grupos experimentales. (E) Tamaño de las lesiones generadas por el tratamiento con DMBA/TPA a los tiempos indicados en los ratones *Snail2*^{-/-} reconstituidos. n= número de ratones en cada grupo experimental.

Un efecto muy llamativo se observó en los ratones *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/-}, que desarrollaron muy pocas lesiones y de menor tamaño a lo largo de todo el tratamiento (Figura 23D y E), incluso el número es inferior comparado con los ratones *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/+}, exhibiendo así un comportamiento similar a los ratones *Snail2*^{+/-} (ver Figura 14C).

El análisis histopatológico de las lesiones reveló que los ratones *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{-/-} presentan un mayor número de SCC respecto a los otros dos grupos experimentales (20% vs 13% y 15%) (Figura 24A), aunque las diferencias no son tan marcadas como en los correspondientes genotipos sin trasplantar (ver Figura 14D).

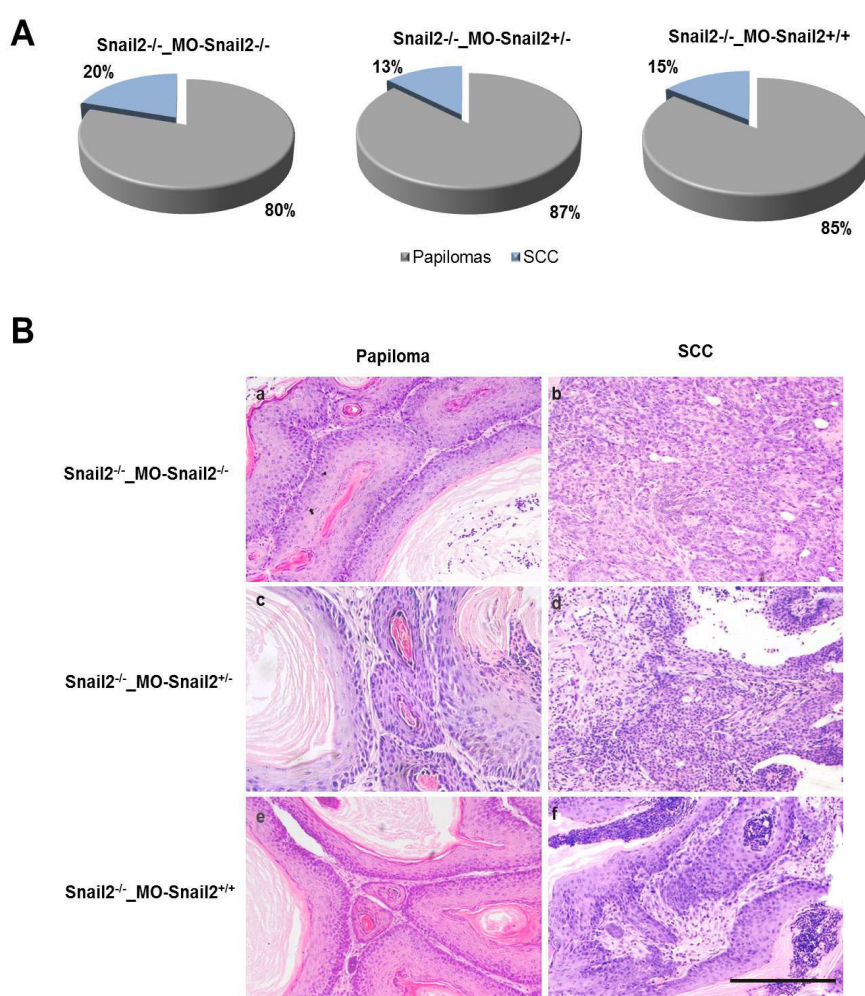


Figura 24. Clasificación y análisis de las lesiones originadas en ratones *Snail2*^{-/-} reconstituidos y sometidos a carcinogénesis química. (A) Gráficas que muestran la distribución de las lesiones en porcentaje, clasificadas como papilomas y SCC de ratones *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{-/-}, *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/+}. **(B)** Imágenes representativas de las tinciones con H&E de las lesiones de los tres grupos de ratones. Escala: 500 μ m.

En conjunto, estos resultados refuerzan la hipótesis de que la ausencia de *Snail2* en los precursores hematopoyéticos ejerce un papel clave en el desarrollo y progresión de las lesiones de piel, mientras que la disminución de la dosis de *Snail2* tiene un efecto global protector.

1.3.3. Influencia de la ausencia de *Snail2* en la acumulación del componente inflamatorio en la carcinogénesis química de piel.

Para profundizar en el papel de *Snail2* en el comportamiento inflamatorio, de forma complementaria al estudio de las lesiones tumorales en los ratones trasplantados con fondo genético *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-}, se analizaron las poblaciones de células mieloides, linfocitos T y linfocitos B en dichas lesiones, sangre periférica y médula ósea de los diferentes grupos experimentales al término del tratamiento con DMBA/TPA (Figura 25).

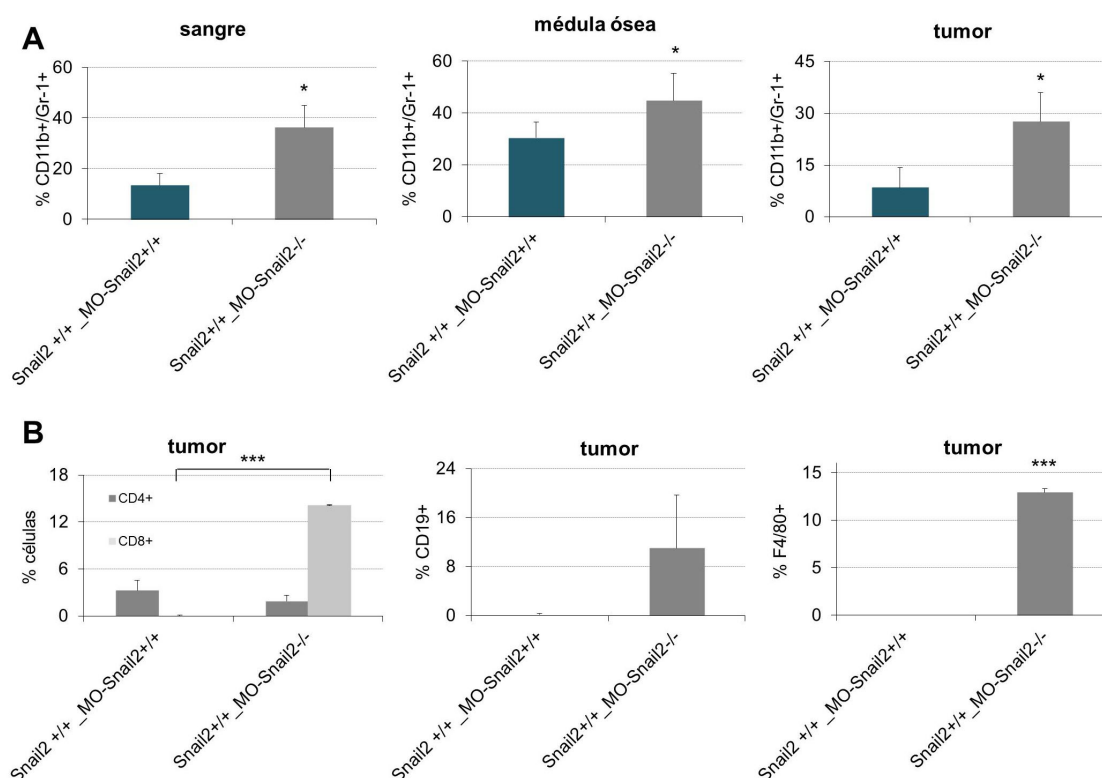


Figura 25. Efecto de la delección constitutiva de *Snail2* en precursores hematopoyéticos sobre la movilización de células inflamatorias. Análisis por citometría de flujo de células (A) CD11b⁺/Gr1⁺ en muestras de sangre periférica (izquierda), médula ósea (centro) y lesiones tumorales (derecha); (B) poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ (izquierda), CD19⁺ (centro) y F4/80⁺ (derecha) de lesiones tumorales. En ambos casos los datos corresponden a muestras obtenidas de ratones *Snail2*^{+/+} _MO-*Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{+/+} _MO-*Snail2*^{-/-} tratados con DMBA/TPA. *p<0,05; ***p<0,001.

Los resultados obtenidos con los ratones de fondo silvestre y trasplantados con médula ósea de ratones *Snail2*^{+/+} o *Snail2*^{-/-} indicaron que tanto en sangre, como médula ósea y en las

lesiones tumorales, se produce un incremento significativo de la población de precursores mieloides ($\text{Cd11b}^+/\text{Gr1}^+$) en los ratones $\text{Snail2}^{+/+}$ _MO- $\text{Snail2}^{-/-}$ comparado con los controles $\text{Snail2}^{+/+}$ _MO- $\text{Snail2}^{+/+}$ (Figura 25A). Además, observamos un aumento de la población de linfocitos T (CD8^+) y B (CD19^+), y en la población de macrófagos F4/80^+ en las lesiones tumorales $\text{Snail2}^{+/+}$ _MO- $\text{Snail2}^{-/-}$ comparado con las lesiones $\text{Snail2}^{+/+}$ _MO- $\text{Snail2}^{+/+}$ (Figura 25B).

Por último, analizamos la población mieloide de las lesiones de los ratones trasplantados con fondo genético $\text{Snail2}^{-/-}$, y los resultados mostraron que los ratones $\text{Snail2}^{-/-}$ _MO- $\text{Snail2}^{+/+}$ y $\text{Snail2}^{-/-}$ _MO- $\text{Snail2}^{+/+}$ presentan un porcentaje inferior, aunque no significativo, de la población de precursores mieloides tanto en sangre, como en médula y lesiones tumorales ($p: 0,113$; $p: 0,145$; $p: 0,085$, respectivamente) respecto al grupo control $\text{Snail2}^{-/-}$ _MO- $\text{Snail2}^{-/-}$ (Figura 26).

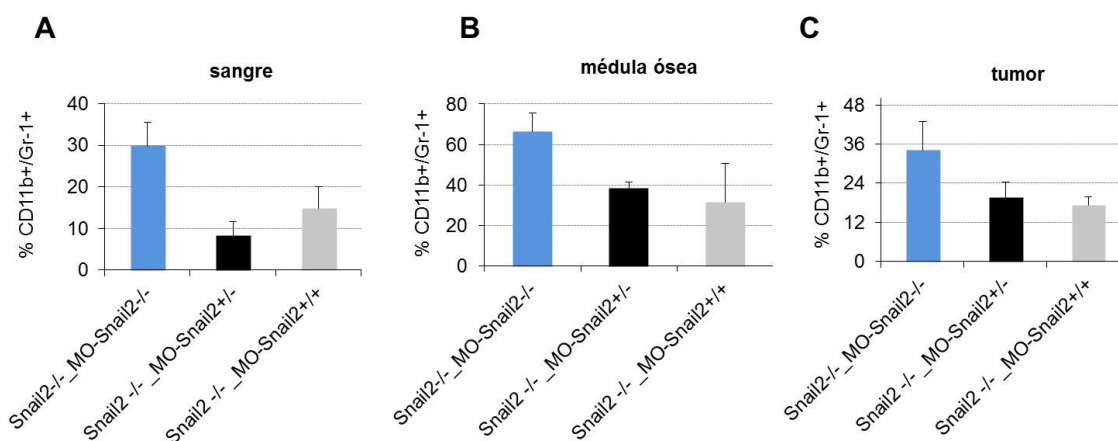


Figura 26. Análisis de la población mieloide en muestras de ratones $\text{Snail2}^{-/-}$ reconstituidos con médula ósea y sometidos a carcinogénesis química. Porcentaje de la población mieloide $\text{CD11b}^+/\text{Gr1}^+$ en sangre periférica (A), médula ósea (B) y lesiones tumorales (C) en ratones $\text{Snail2}^{-/-}$ _MO- $\text{Snail2}^{-/-}$, $\text{Snail2}^{-/-}$ _MO- $\text{Snail2}^{+/+}$ y $\text{Snail2}^{-/-}$ _MO- $\text{Snail2}^{+/+}$ tras ser tratados con DMBA/TPA.

Los datos obtenidos en estos dos grupos de experimentos demuestran que la delección constitutiva de *Snail2* del componente hematopoyético promueve el incremento de la población mieloide, bien sea por bloqueo de su diferenciación o por aumento de su proliferación, lo que podría estar contribuyendo a la progresión tumoral observada en los ratones $\text{Snail2}^{-/-}$.

1.3.4. Alteraciones moleculares de las lesiones originadas en la carcinogénesis química.

Tras observar el efecto de la delección constitutiva de *Snail2* en los precursores hematopoyéticos sobre la población mieloide $\text{CD11b}^+/\text{Gr1}^+$ en el proceso de carcinogénesis química, y basándonos en otros estudios que apuntan a que esta población tiene gran importancia en la progresión tumoral (Rodríguez and Ochoa, 2008; Kowanetz et al., 2010; Qian et al., 2011),

procedimos a caracterizar algunas de las vías de señalización implicadas en la acción de los precursores mieloides en este proceso.

Uno de los mecanismos por los cuales los precursores mieloides favorecen la progresión tumoral es mediante el aumento de la señalización de la vía Wnt/ β -catenina en las células próximas a ellos, debido a que secretan ligandos de la vía de Wnt (Di Piazza et al., 2012). Por ello, analizamos la presencia de estos ligandos en los tumores de ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-}. Los resultados obtenidos mostraron un aumento generalizado en ligandos de la vía Wnt/ β -catenina canónica, como *Wnt3a* y *Wnt10a*, y de forma significativa en el ligando de la vía no canónica *Wnt4* en las lesiones de los ratones *Snail2*^{-/-} respecto a las de los ratones *Snail2*^{+/+} (Figura 27A). Adicionalmente, la expresión del agonista de la vía periostina (*Postn*) (Malanchi et al., 2012), se incrementa en las lesiones *Snail2*^{-/-} respecto de las lesiones *Snail2*^{+/+} (Figura 27A). Por lo tanto, estos datos junto con la localización nuclear de β -catenina observada en las lesiones *Snail2*^{-/-} (Figura 17), podrían indicar que la población mioelide y las interacciones entre las células tumorales y el estroma activan la vía Wnt/ β -catenina en las lesiones de ratones *Snail2*^{-/-}.

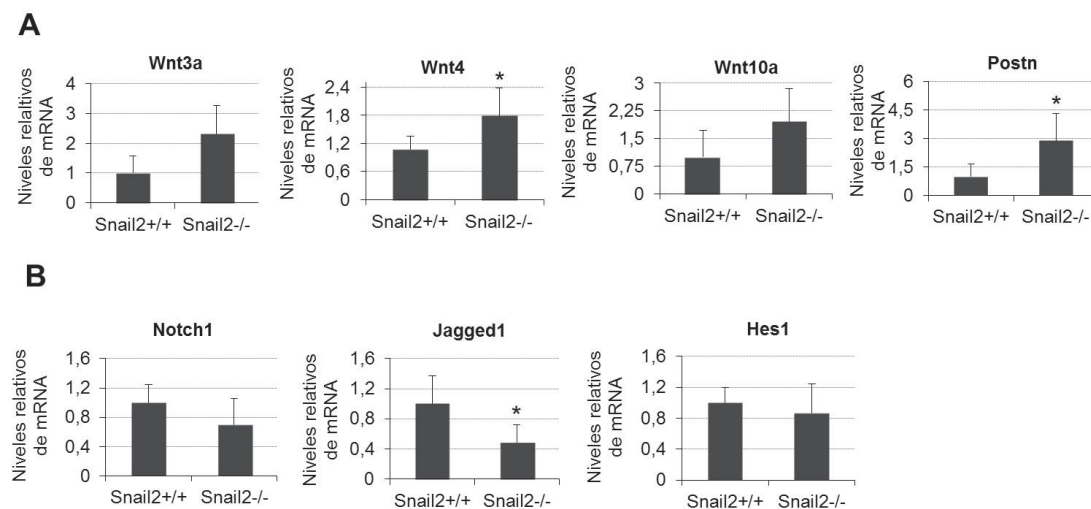


Figura 27. Análisis de las vías de Wnt y Notch1 en las lesiones inducidas por DMBA/TPA. (A) Análisis de la vía de Wnt/ β -catenina. Niveles de mRNA de ligandos de la vía de Wnt/ β -catenina y *Postn*. **(B)** Análisis de la vía de Notch1 mediante la cuantificación de los niveles de mRNA de *Notch1*, *Jagged1* y *Hes1* de lesiones tumorales inducidas por DMBA/TPA en ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-}. * $p < 0,05$.

Una ruta de señalización importante, tanto para la homeostasis epidérmica como para los precursores mieloides, es la vía Notch, implicada en la diferenciación de ambos tipos celulares (Dotto, 2008; Okuyama et al., 2008; Saleem and Conrad, 2011; Massi and Panelos, 2012; Cheng et al., 2014). Alteraciones en esta vía pueden originar la acumulación de los precursores mieloides evitando su progresión hacia poblaciones especializadas como macrófagos, neutrófilos y DCs

(Saleem and Conrad, 2011). El análisis de marcadores de esta vía, como *Notch1*, su ligando *Jagged1* y la diana *Hes1*, mostró una disminución significativa en los niveles de *Jagged1*, y una tendencia para *Notch1*, en las lesiones *Snail2*^{-/-} respecto a las lesiones *Snail2*^{+/+} (Figura 27B), sugiriendo que alteraciones en la diferenciación pueden estar contribuyendo al comportamiento anómalo de los precursores mieloides en dichas lesiones (Figura 27B).

En conjunto, estos resultados apoyan que la delección constitutiva de *Snail2* en los progenitores hematopoyéticos promueve la acumulación de precursores mieloides, lo cual puede dar lugar a un incremento de la activación de, al menos, la vía de Wnt/ β -catenina y una disminución de la vía de Notch1 en las lesiones de los ratones *Snail2*^{-/-}, originando así un microambiente pro-tumoral que favorece la progresión tumoral.

Parte 2. Caracterización funcional de los dominios de unión a DNA de Snail1 y Snail2, y de los dominios SNAG y SLUG de SNAIL2.

Tal y como se ha descrito en la Introducción, Snail1 y Snail2 son dos factores de transcripción con una región de unión al DNA altamente homóloga (87% de homología excluyendo el ZF1 de Snail2). Sin embargo, a pesar de esta homología, cada factor ejerce funciones específicas, de tal manera que son capaces de reprimir la expresión de genes de forma diferencial (Moreno-Bueno et al., 2006), y presentan afinidades diferentes en la interacción con el elemento E-pal del promotor de *cadherina-E* (Bolos et al., 2003). Hasta la fecha se desconoce la base estructural que da lugar a esta divergencia funcional entre los factores Snail1 y Snail2. Por ello, nos propusimos analizar en detalle el papel que desempeña cada uno de los ZFs de ambos factores en la unión al DNA. Asimismo, profundizamos en la relevancia funcional de los dominios SNAG y SLUG, y de la recientemente descrita fosforilación de la serina 4 del dominio SNAG de Snail2 (Molina-Ortiz et al., 2012).

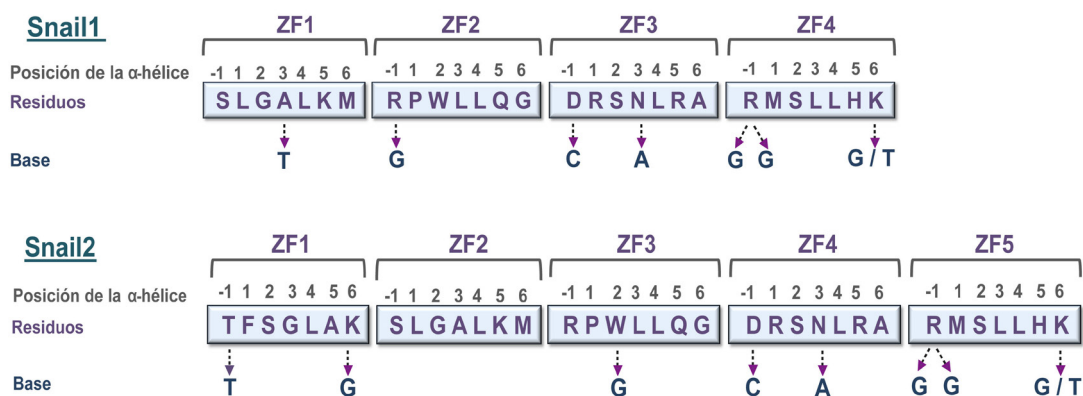
2.1. Análisis *in silico* de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2.

Como una primera aproximación al estudio funcional del dominio DBD de ZFs de Snail1 y Snail2, llevamos a cabo un estudio *in silico* para establecer un modelo de unión de Snail1 y Snail2 a las cajas-E (CAGGTG) presentes en el elemento E-pal del promotor murino de *cadherina-E* (Behrens et al., 1991; Hennig et al., 1996; Cano et al., 2000). Como una etapa previa a la elaboración del modelo, analizamos los residuos de contacto de los dedos de zinc a las bases nucleotídicas y a los grupos fosfatos del DNA. Una vez determinado los elementos de contacto entre el DNA y los factores Snail1 y Snail2 procedimos a elaborar un modelo de unión mediante modelado computacional.

2.1.1. Identificación de los residuos implicados en el contacto con las bases del DNA.

Los ZFs del tipo C_2H_2 se pueden unir al DNA de dos formas distintas que se han denominado canónica y no canónica (Pabo et al., 2001). El criterio fundamental utilizado para esta clasificación consiste en determinar las bases a las que se unen los residuos de reconocimiento o de contacto así como identificar la presencia o no de determinados aminoácidos en posiciones clave para establecer otro tipo de interacciones con la estructura del DNA.

A MODELO CANÓNICO



B MODELO NO CANÓNICO

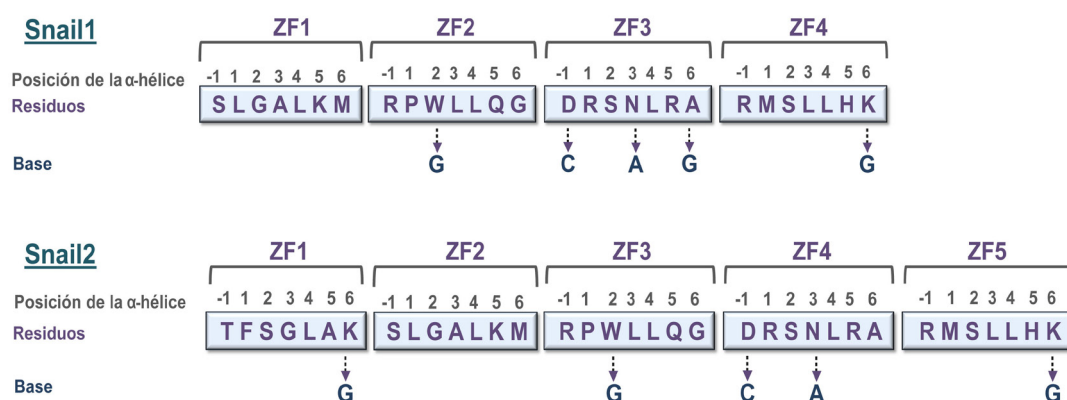


Figura 28. Esquema del estudio de interacción de los residuos de contacto de los ZFs de Snail1 y Snail2 según el modelo canónico y no canónico. (A) Posibilidades de interacción de las posiciones -1, 3 y 6 de la α -hélice de los ZFs de Snail1 y Snail2 según el modelo canónico. **(B)** Posibilidades de interacción entre los aminoácidos indicados y bases según el modelo de predicción no canónico en el caso de los ZFs de Snail1 y Snail2.

Tal como se ha descrito en la Introducción, los residuos de contacto de los ZFs son capaces de reconocer subsitios de tres pares de bases en función del código de reconocimiento que existe entre aminoácidos y bases del DNA (Pabo et al., 2001). En primer lugar se analizó cuáles serían los residuos de contacto de cada uno de los ZFs de Snail1 con las bases de las cajas-E (CAGGTG). Según los modelos teóricos, si Snail1 sigue el patrón canónico, las interacciones de las α -hélices de sus ZFs se establecerían de la siguiente manera: ZF1 con una timina a través de su posición 3 (A), y ZF2, con una guanina a través de su posición -1 (R), por su parte, ZF3 y ZF4 reconocerían una secuencia de tipo CAGG-T/G, siendo los residuos clave las posiciones -1 (D) y 3 (N) del ZF3, que interaccionarían con citosina y adenina, respectivamente, y las posiciones -1 (R) y 6 (K) del ZF4, que lo harían con dos guaninas y una timina o guanina (Figura 28A). La secuencia descrita teóricamente concuerda por lo tanto con la estructura que típicamente reconocen estos factores, es decir, la secuencia de tipo caja-E, a excepción de una posición en el segundo triplete. Por otro

lado, si el modelo de unión al DNA de Snail1 fuera el no canónico, la posición 2 del ZF2 (W) podría interaccionar con una guanina, y el ZF3 reconocería una secuencia C-A-G a través de diferentes residuos (D, N, A) (Figura 28B). Los datos obtenidos sugieren que el ZF3 y ZF4 de Snail1 siguen el modelo canónico al coincidir la secuencia predicha con la real, al menos en una mayor medida que si fueran no canónicos. En cuanto a Snail2, del ZF3 al ZF5 tienen los mismos residuos de contacto que los ZF2-ZF4 de Snail1, por lo que se puede extrapolar lo que se ha observado en el caso de Snail1 y podemos describir al ZF4 y ZF5 de Snail2 como ZFs canónicos. El ZF1 adicional de Snail2 podría interaccionar con timina a través del residuo -1 (T), y con timina o guanina con el residuo 6 (K) según el modelo canónico (Figura 28A), y con guanina por el residuo 6 según el modelo no canónico (Figura 28B).

2.1.2. Identificación de los residuos aminoacídicos implicados en la interacción con los grupos fosfato de la hebra mayor del DNA e importancia de los conectores.

Existen una serie de residuos de los ZFs que pueden interaccionar con grupos fosfato del DNA de manera más o menos conservada. Al estudiar la presencia de estos residuos en Snail1 y Snail2, encontramos que el contacto con fosfato más conservado que presentan los ZFs, es la interacción de la posición 7 de la α -hélice (H7), presente en todos los ZFs de Snail1 y Snail2, con el fosfato del lado 5' (Figura 29), asociándose la presencia de este residuo fundamentalmente con el modelo de unión canónico (Pabo et al., 2001). Todos los ZFs de Snail1 y Snail2 también presentan el segundo contacto con fosfato más conservado, que es el que se produce entre la lisina o arginina de la posición 1 de la segunda lámina- β (Figura 29) y el mismo fosfato con el que contacta la H7.

Los aminoácidos localizados en la secuencia entre los ZFs (conectores) son un factor clave en la estructura tridimensional (3D) de los dominios ZFs, dado que tanto la organización interna como entre los distintos ZFs es importante para el reconocimiento del DNA (Wolfe et al., 2000; Pabo et al., 2001). El denominado conector canónico está formado por la secuencia TGEKP, y la presentan los conectores entre los ZF2 y ZF3 de Snail1 y entre los ZF3 y ZF4 de Snail2 (Figura 30). El tercer contacto con fosfato más conservado se establece a través de la lisina de la secuencia consenso del conector TGEKP, de forma directa o mediada por agua (Figura 30). También hay que tener en cuenta que otros conectores de Snail1 (ZF3-ZF4) y Snail2 (ZF4-ZF5) presentan en la cuarta posición una lisina, con lo que son susceptibles de interacciones con fosfatos a través de este residuo.

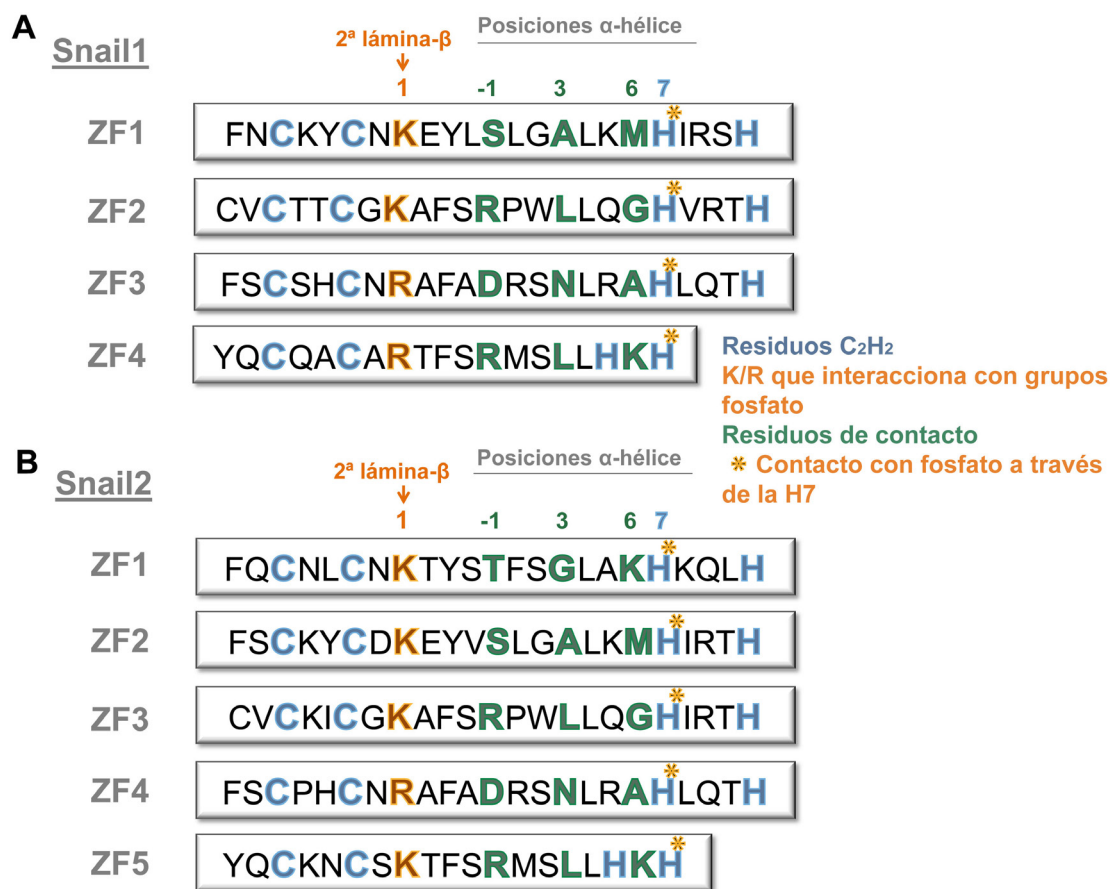


Figura 29. Análisis de las posiciones clave de los ZFs de Snail1 y Snail2. (A) Secuencia de los ZFs de Snail1 con los residuos clave para su interacción con el DNA y la estructura 3D marcados según el código de colores. (B) Secuencia de los ZFs de Snail2 con posiciones clave marcadas según el código de colores.

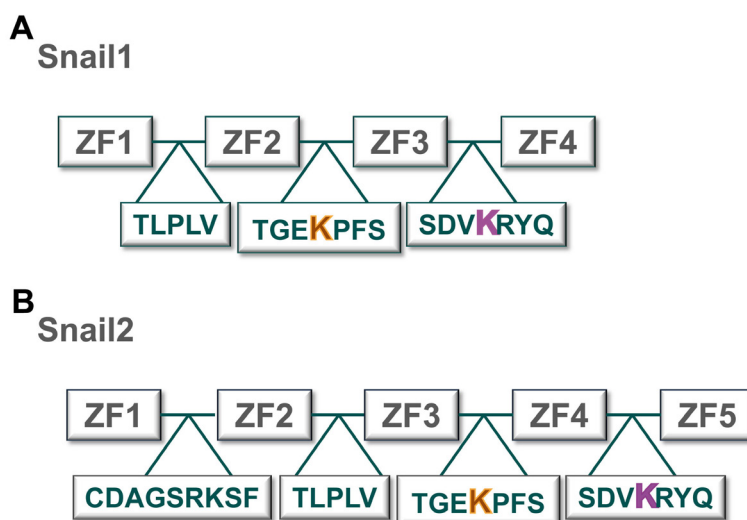


Figura 30. Análisis de los conectores de Snail1 y Snail2. Secuencia de los conectores de Snail1 (A) y Snail2 (B). En naranja están marcadas las lisinas de los conectores canónicos importantes para su interacción con fosfato, y en morado, lisinas que potencialmente pueden ser capaces de establecer este tipo de contacto.

2.1.3. Modelo de unión a cajas-E de los ZFs de Snail1 y Snail2.

Una vez analizados los aminoácidos de contacto de los ZFs, se elaboró un modelo 3D de las interacciones moleculares que Snail1 y Snail2 establecen con las cajas-E del DNA mediante análisis computacional por modelado de homología (ver Materiales y Métodos). El modelo propuesto de reconocimiento específico entre la secuencia de caja-E y los factores Snail1 y Snail2 incluye un modelo de interacción ZF-DNA clásico proteína-DNA, en el que los residuos de la α -hélice establecen puentes de hidrógeno y otros contactos favorables con las bases del DNA. Los aminoácidos involucrados en las interacciones son compatibles con otras secuencias de reconocimiento de ZFs naturales (Wolfe et al., 2000) y dominios de ZFs diseñados (Segal et al., 2006).

En el estudio de Snail1, el modelo generado mostró que los cuatro ZFs están rodeando la doble hélice de DNA y establecen puentes de hidrógeno con grupos fosfato a través del ZF1 y ZF2, mientras que el ZF3 y ZF4 establecen puentes de hidrógeno con bases específicas que coinciden con la secuencia de una caja-E (CAGGTG) (Figura 31A). Los residuos de la α -hélice de ZF3 y ZF4 implicados en el reconocimiento son el Asp-219, Asn-222 y Ala-225 del ZF3, y Arg-247, Leu-250 y Lys-253 del ZF4, de acuerdo con la unión de tipo canónica de ZFs de tipo C_2H_2 (Wolfe et al., 2000) (Figura 31A). En el análisis de estas interacciones hay que considerar que la unión a fosfatos y a bases tienen la misma importancia, porque una correcta interacción con grupos fosfato permite alcanzar la organización espacial más apropiada para los contactos base-proteína (Wolfe et al., 2000).

El modelo 3D generado para las interacciones de Snail2 presenta una organización espacial similar al modelo de Snail1 (Figura 31B), en el que los ZF2 y ZF3 (equivalentes a ZF1 y ZF2 de Snail1) establecen conexiones con grupos fosfato a través de puentes de hidrógeno, y los ZF4 y ZF5 (correspondiente a ZF3 y ZF4 de Snail1) se unen a través de puentes de hidrógeno a las bases correspondientes de la caja-E mediado por los residuos de sus α -hélice: Asp-225, Asn-228 y Ala-231 del ZF4, y Arg-253, Leu-256 y Lys-259 del ZF5 (Figura 31B). El ZF1 de Snail2 no interacciona con el DNA, de acuerdo con estudios previos (Pavletich and Pabo, 1993).

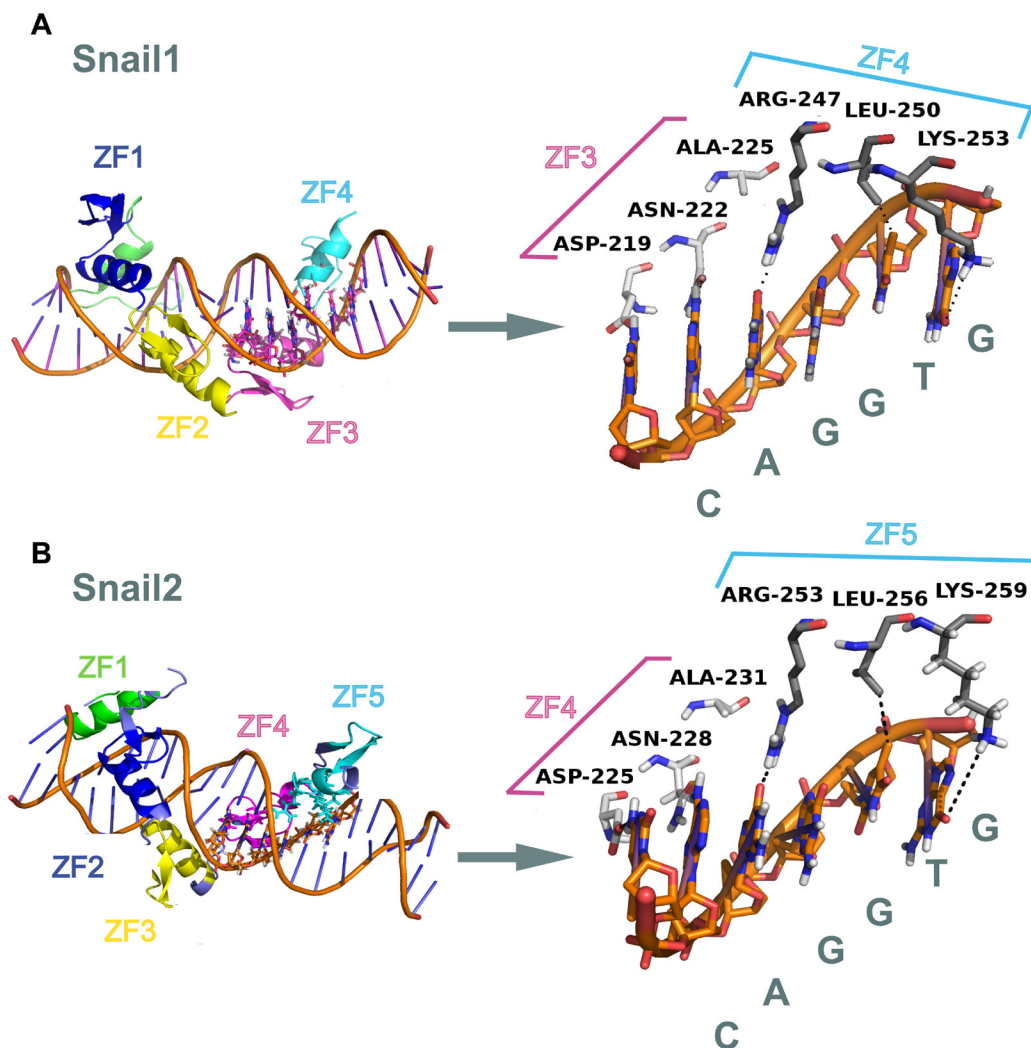


Figura 31. Representación esquemática de la estructura de los ZFs de Snail1 y Snail2 en su interacción con el DNA (caja-E). (A) Modelo tridimensional de interacción del DBD de Snail1 con el DNA (izquierda). A la derecha se detalla como el ZF3 y ZF4 de Snail1 se unen a las bases indicadas directamente a través de los residuos mostrados, mientras que los dos primeros ZFs no establecen este tipo de contactos, sino que interaccionan indirectamente. (B) Modelo tridimensional del DBD de Snail2 con el DNA (izquierda). A la derecha se detalla como el ZF4 y ZF5 de Snail2 se unen a las bases indicadas del DNA directamente a través de los residuos mostrados, mientras que el ZF2 y ZF3 establecen interacciones indirectas y el ZF1 no interacciona.

Una vez elaborados los modelos 3D de unión de Snail1 y Snail2 al DNA, decidimos analizar el efecto que tendría sobre el modelo la eliminación de la estructura terciaria de diferentes ZFs de Snail1 y Snail2. Para tal fin se reemplazó, en la secuencia de Snail1 y Snail2, la primera cisteína de cada ZF por una alanina y se analizó el efecto de tal sustitución sobre la unión al DNA mediante simulaciones dinámicas moleculares (Figura 32). Decidimos analizar el efecto de esta mutación en los ZFs que interaccionan con fosfatos en Snail1 (ZF1 y ZF2), y dada la equivalencia estructural de los ZFs entre Snail1 y Snail2, en el caso de Snail2 elegimos mutar un ZF que interacciona con grupos fosfato (ZF3) y un ZF que interacciona específicamente con bases (ZF4, ya que el ZF5 no

tiene la estructura clásica de un ZF al tener un único aminoácido entre las histidinas que coordinan el zinc), de esta manera hacemos dos aproximaciones complementarias para estudiar los ZFs que interaccionan con el DNA.

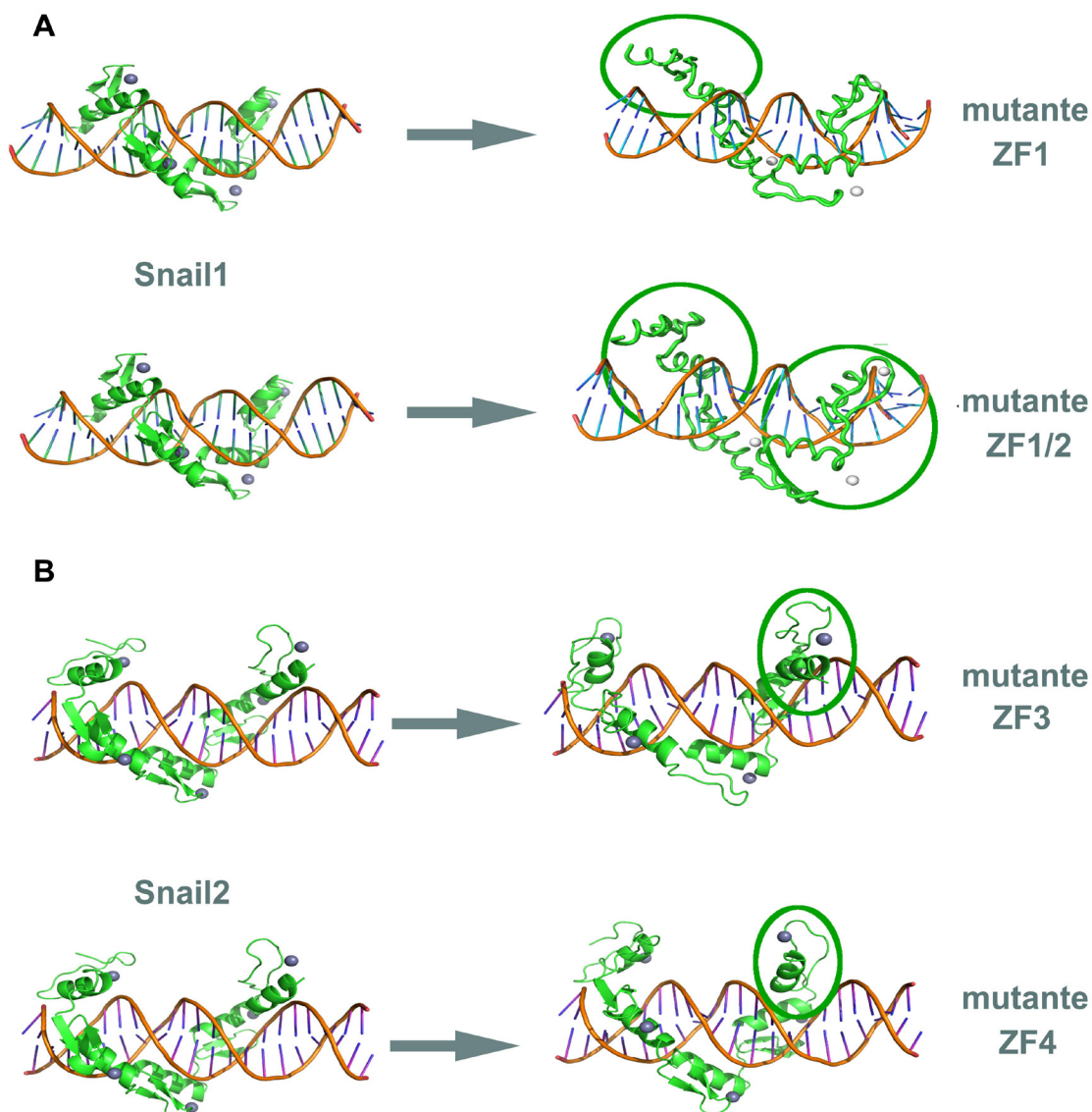


Figura 32. Representación esquemática de la interacción de Snail1 y Snail2 con el DNA y consecuencia de modificar sus ZFs. (A) Modelo tridimensional que muestra las consecuencias de destruir el ZF1 o ZF1/2 de Snail1, originando una pérdida casi completa de interacción entre el DNA y la proteína en comparación con el modelo de Snail1 silvestre. **(B)** Modelo tridimensional que muestra las consecuencias de destruir el ZF3 o ZF4 de Snail2, originando la pérdida de una correcta interacción con el DNA en comparación con el modelo de Snail2 silvestre.

En el caso de Snail1, se comparó el efecto de destruir la estructura del ZF1, o del ZF1 y ZF2 (mutante ZF1/ZF2) conjuntamente, mientras que para Snail2 se estudió el efecto de eliminar la conformación del ZF3 o del ZF4 de forma independiente. Para llevar a cabo este análisis, las simulaciones se realizaron en paralelo entre las proteínas en su forma silvestre y mutada,

comparando el estado final de la simulación. Los complejos simulados fueron estables en el caso de las estructuras silvestres, mientras que en el caso de los mutantes en los ZFs, se observó una pérdida parcial o completa de los contactos específicos modelados. El estudio de Snail1 indicó que la destrucción de ZF1 (C156A) o ZF1 y ZF2 (C156A; C182A) por mutación puntual origina un gran desplazamiento de la posición original del dominio de unión al DNA de Snail1, afectando no solo a las interacciones que establecen el ZF1 y ZF2 con los fosfatos del DNA, sino que la unión de ZF3 y ZF4 a las bases específicas se debilita en el caso del mutante del ZF1, o se pierden completamente en el mutante ZF1/ZF2 (Figura 32A). En el análisis de Snail2, la mutación puntual del ZF3 (C188A) o del ZF4 (C216A) origina un desplazamiento completo de las interacciones con las bases del DNA, afectando por lo tanto también a las interacciones del ZF5 (Figura 32B).

Los estudios de simulación estructural sugieren que la integridad de los dedos de zinc ZF1 y ZF2 de Snail1 y ZF3 y ZF4 de Snail2 se requiere para el adecuado reconocimiento y unión a la secuencia de tipo caja-E de ambos factores.

2.2. Caracterización funcional de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2.

Estudios previos han demostrado que Snail1 y Snail2 actúan como represores transcripcionales sobre sus genes diana, uniéndose a elementos de tipo cajas-E presente en los promotores de dichos genes, tales como *cadherina-E* o *claudina-1* (Batlle et al., 2000; Bolos et al., 2003; Martinez-Estrada et al., 2006; Molina-Ortiz et al., 2012), aunque con diferente afinidad *in vitro* en el caso del elemento E-pal (Bolos et al., 2003). Hasta el inicio de esta tesis se desconocía la implicación individual de los ZFs de cada factor o la importancia de la organización de las cajas-E de los promotores diana. Por ello, estudiamos el efecto de mutantes puntuales en los diferentes ZFs de Snail1 y Snail2 en su actividad represora sobre diferentes promotores.

2.2.1. Actividad represora y afinidad por promotores diana de los mutantes en los dedos de zinc de Snail1.

Para el estudio funcional de los ZFs de Snail1, se generaron mutantes puntuales que desorganizaban la estructura terciaria de cada uno de los ZFs mediante el reemplazamiento de la primera cisteína de cada ZF por alanina. Posteriormente, se analizó su efecto sobre la represión de los promotores de *cadherina-E* de ratón y humano en células HEK293T. Ambos promotores presentan una distribución de cajas-E diferente (Figura 33A-D). En el caso de Snail1 los resultados obtenidos con el promotor murino indicaron que la destrucción individual de sus ZFs no afecta a la capacidad represora de Snail1, a excepción del ZF4, cuya destrucción aumenta ligeramente dicha capacidad (Figura 33A). Estos resultados sugieren que la mutación individual de los ZFs de

Snail1 no tiene un efecto significativo en su actividad represora sobre el promotor de *cadherina-E* murino. Por tanto, a continuación decidimos utilizar mutantes en los que se eliminase la estructura terciaria de diferentes combinaciones de ZFs (ZF1/2/4, ZF2/3/4, ZF3/4, y ZF1/2). El análisis de la capacidad represora de las diferentes combinaciones de mutantes mostró que la destrucción conjunta de los ZF1 y ZF2 de Snail1 elimina prácticamente su actividad represora (Figura 33B), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el estudio de simulación tridimensional. Sin embargo, la destrucción de los ZF3 y ZF4 no es suficiente para eliminar la actividad represora de Snail1 sobre el promotor murino de *cadherina-E* (Figura 33B). Por lo tanto, los ZF1 y ZF2 de manera conjunta son esenciales para la represión de Snail1 sobre el promotor de *cadherina-E* murino. De forma análoga, realizamos el mismo tipo de estudios sobre el promotor de *cadherina-E* humano, y al contrario de lo que ocurría con el promotor murino, la mutación individual de cualquier ZF disminuye la capacidad represora de Snail1, indicando que en este contexto todos los ZFs contribuyen a la represión (Figura 33C). Los resultados obtenidos con los mutantes combinados de Snail1 mostraron que todas las combinaciones eliminan por completo la capacidad de represión sobre el promotor de *cadherina-E* humano (Figura 33D). Resultados similares se obtuvieron al utilizar células MDCK-II en los ensayos de promotor (datos no mostrados). Para comprobar si el comportamiento observado es ampliable a otros promotores con cajas-E, realizamos el mismo tipo de ensayos con el promotor de *claudina-1* humano, que contiene 2 cajas-E separadas (Figura 33E y F) y para el que se ha descrito anteriormente su represión por Snail1 y Snail2 (Martínez-Estrada et al., 2006). Los resultados obtenidos indican que la mutación individual de los ZFs 1 a 3 de Snail1 elimina parcialmente la actividad represora y que se requiere la destrucción conjunta del ZF1 y ZF2 para ocasionar una pérdida completa de la represión (Figura 33E y F). Para descartar que la pérdida de represión observada fuese debida a problemas en el transporte al núcleo de los diferentes mutantes, se analizó la localización celular de cada una de las variantes de Snail1. Como se puede apreciar en la Figura 34, todos los mutantes de Snail1 presentaban una localización nuclear al igual que Snail1 silvestre, con un patrón difuso a excepción de los mutantes ZF1 y ZF3 que presentaron una tinción punteada (Figura 34A).

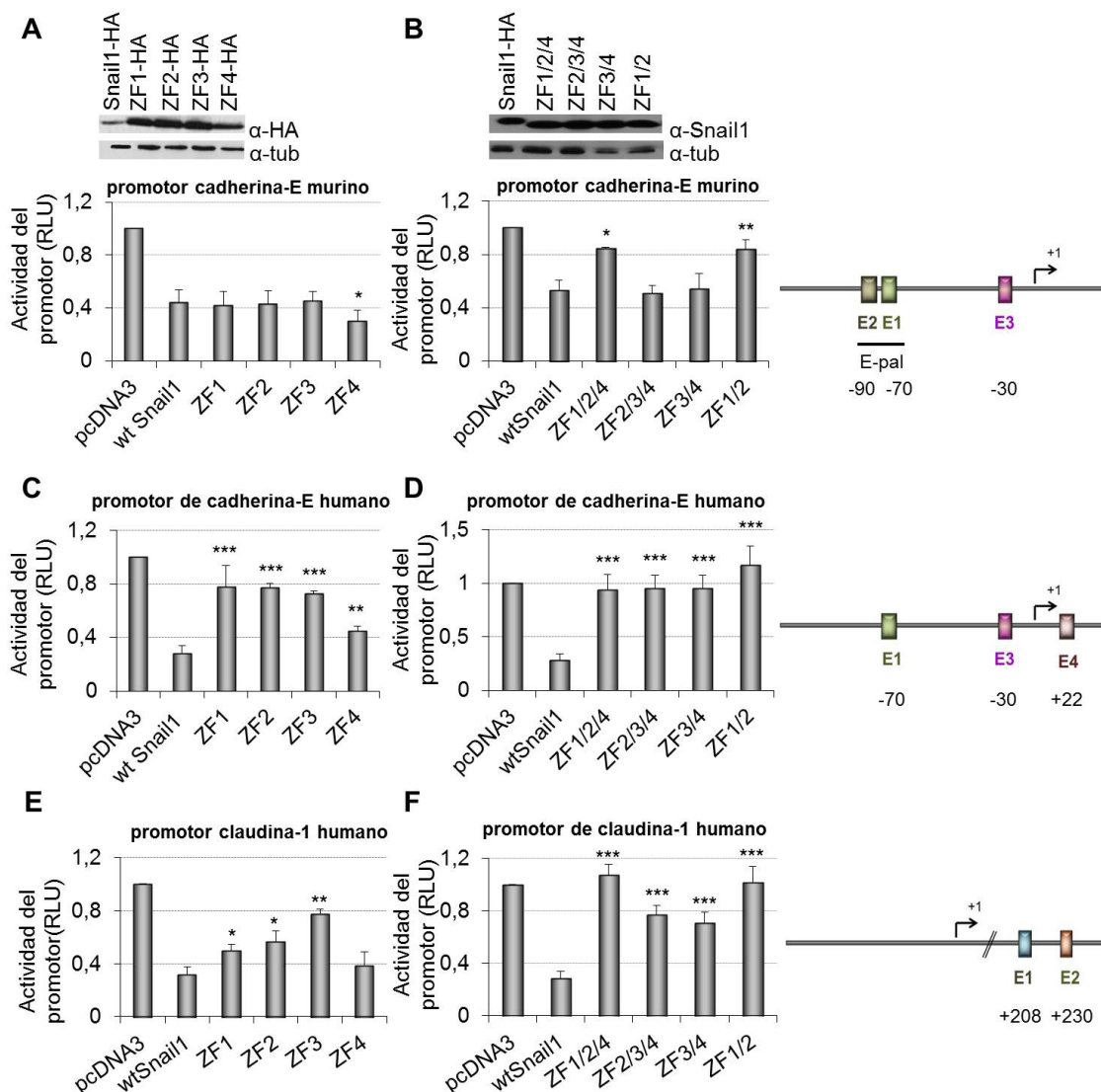


Figura 33. Análisis de los ZFs de Snail1 en la represión de *cadherina-E* y *claudina-1*. (A) y (B) Actividad represora de Snail1 y los mutantes individuales (A) o combinados (B) de los ZFs sobre el promotor de *cadherina-E* murino en células HEK293T. (C) y (D) Actividad represora de Snail1 y los mutantes individuales (C) o combinados (D) sobre el promotor de *cadherina-E* humano. (E) y (F) Actividad represora de Snail1 y los mutantes de los ZFs individuales (E) o combinados (F) sobre el promotor de *claudina-1* humano. La actividad (RLU) está normalizada con la que muestran las células transfectadas con el vector control pcDNA3. Los datos representan la media \pm d.s. de cinco experimentos con triplicados para cada condición. Los western-blot de la parte superior del panel muestran la eficacia de transfección de Snail1 y los diferentes mutantes. Los esquemas de la derecha muestran la organización de cajas-E en los tres promotores analizados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Una vez analizada la relevancia de los ZF1 y ZF2 de Snail1 sobre su capacidad represora, se procedió a analizar el efecto de las mutaciones sobre la capacidad de unión al DNA *in vivo*. Por ello, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en células HEK293T y NMuMG en los que se analizó la capacidad de unión a los promotores de *cadherina-E* humano y

murino, respectivamente, de los mutantes ZF1, ZF2 y ZF1/ZF2. Los resultados obtenidos (Figura 34B y C) indican que sólo la destrucción conjunta de los ZF1 y ZF2 origina una pérdida significativa de la unión de Snail1 a los promotores de *cadherina-E* humano y murino endógenos, sin que la destrucción individual del ZF1 o ZF2 tenga un efecto significativo en la misma (Figura 34B y C). Para verificar estos resultados, también se analizó la unión de los diferentes mutantes de Snail1 al promotor de *claudina-1* humano, obteniendo resultados similares a los anteriores (Figura 34D).

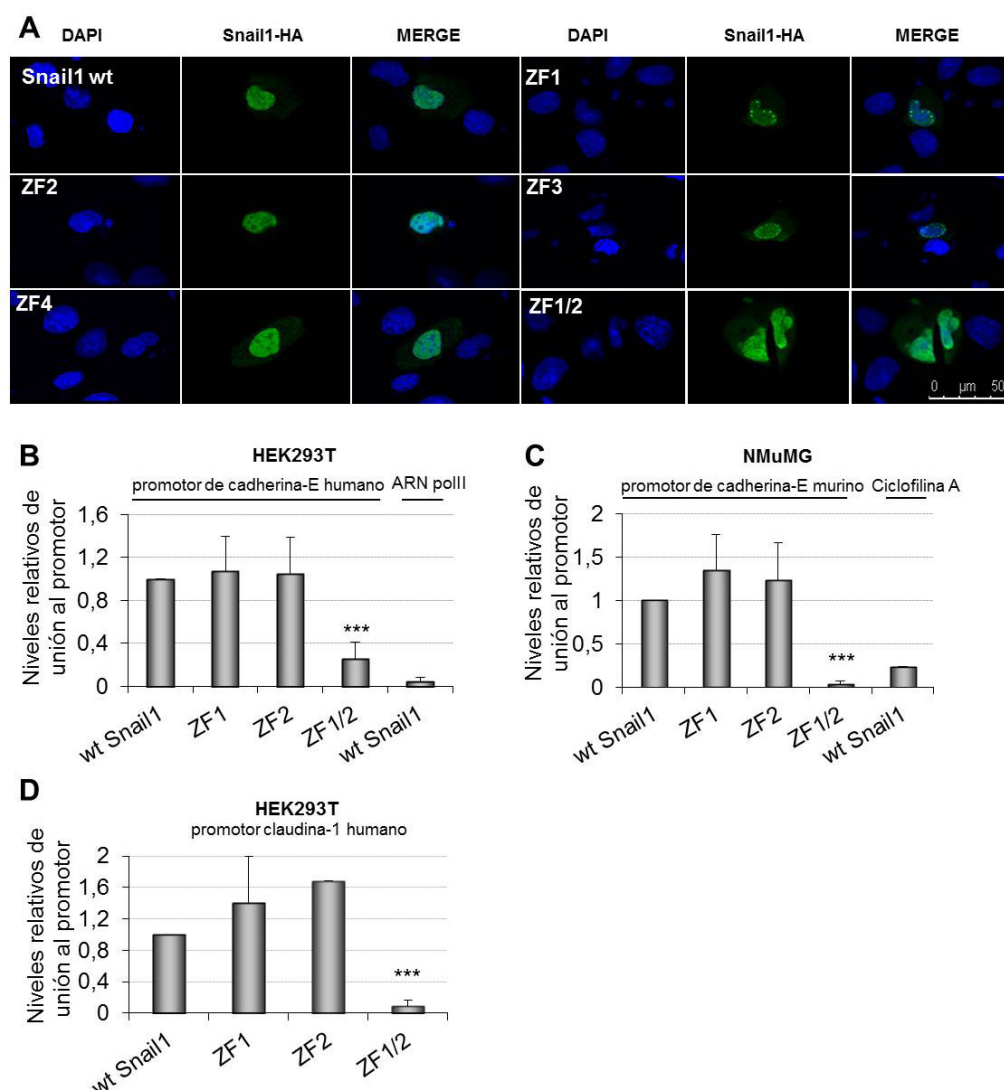


Figura 34. Localización celular y capacidad de unión al DNA de Snail1. (A) Localización subcelular de Snail1 y los mutantes de los ZFs indicados. Los núcleos están teñidos con DAPI. Escala: 50 μ m. (B) y (C) Ensayos de ChIP en las células HEK293T (B) y NMuMG (C) transfectadas con Snail1 y los mutantes de los ZFs indicados para analizar la unión a los promotores de *cadherina-E* humano (B) y murino (C) endógenos. (D) Ensayo de ChIP en células HEK293T para detectar la unión de Snail1 y los mutantes en los ZFs indicados al promotor de *claudina-1* humano. La unión se midió como veces de amplificación relativo al input. Los datos muestran la media \pm d.s. de 3 experimentos. *** $p < 0,001$.

Todos estos datos demuestran que conjuntamente el ZF1 y ZF2 de Snail1 son esenciales para la unión al DNA y la represión de promotores humanos y de ratón, y apuntan a que la diferente arquitectura de ambos promotores tiene influencia en la capacidad de represión de Snail1.

2.2.2. Actividad represora y afinidad por promotores diana de los mutantes en los dedos de zinc de Snail2.

De forma similar a la descrita para Snail1, se procedió a analizar la implicación funcional de los ZFs de Snail2. Para ello, se generaron mutantes puntuales que desorganizaban la estructura terciaria de cada uno de los ZFs y se analizó su efecto sobre la capacidad represora de Snail2 mediante ensayos de promotor en células HEK293T. Los análisis sobre el promotor de *cadherina-E* murino mostraron que la mutación individual de ZF3 o ZF4 de Snail2 origina la pérdida completa de su actividad represora, mientras que la destrucción del ZF1, ZF2 o ZF5 no afectaba a la represión (Figura 35A). El análisis con el promotor de *cadherina-E* humano también mostró una pérdida total de la capacidad represora de Snail2 cuando se destruían individualmente el ZF3 o ZF4, y una pérdida parcial de represión con los mutantes ZF2 y ZF5, sugiriendo que también contribuyen a la capacidad represora sobre el promotor humano (Figura 35B). Como en el caso de Snail1, estos resultados fueron confirmados analizando la capacidad represora de los mutantes de Snail2 sobre el promotor de *claudina-1* humano, observando de nuevo el papel esencial de ZF3 y ZF4, y la contribución parcial del ZF2 y ZF5 a la represión mediada por Snail2 (Figura 35C). La destrucción del ZF1 de Snail2 no afectó a su actividad represora sobre cualquiera de los promotores analizados (Figura 35A-C), confirmando que ZF1 es dispensable para la actividad de Snail2 de acuerdo con datos teóricos previos (Pavletich and Pabo, 1993) y con el modelo tridimensional.

Al igual que en el caso de Snail1, para descartar que la pérdida de represión observada en los mutantes de Snail2 se debiese a problemas en el transporte al núcleo, se analizó la localización celular de cada uno de ellos. Como se puede apreciar en la Figura 36A, todos los mutantes de Snail2 presentaban una localización nuclear, con un patrón punteado compatible con la presencia de Snail2 en gránulos de intercromatina, tal como se había descrito previamente (Hemavathy et al., 2000; Dominguez et al., 2003).

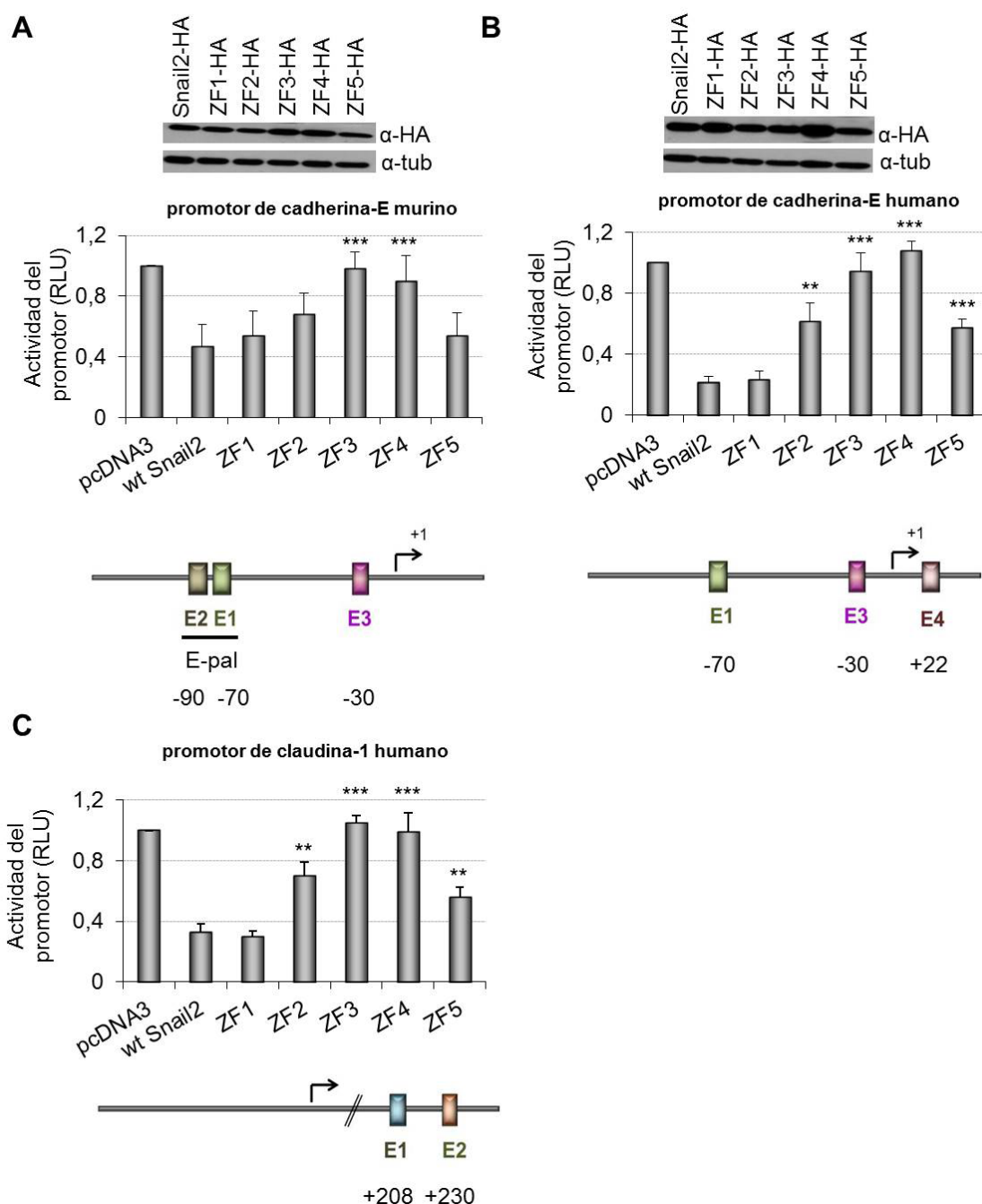


Figura 35. Análisis de la contribución de los ZFs de Snail2 a su capacidad represora. (A) y (B) Actividad represora de Snail2 y los mutantes individuales de los ZFs sobre el promotor de *cadherina-E* murino **(A)** y humano **(B)** en células HEK293T. **(C)** Actividad represora de Snail2 y los mutantes de los ZF sobre el promotor de *claudina-1* humano. La actividad (RLU) está normalizada con la que muestran las células transfectadas con el vector control pcDNA3. Los datos representan la media \pm d.s. de cinco experimentos con triplicados para cada condición. Los western-blot de la parte superior del panel muestran la eficacia de transfección de Snail1 y los diferentes mutantes. Los esquemas en la parte inferior de cada gráfica muestran la organización de cajas-E en los tres promotores analizados. **p<0,005; ***p<0,001.

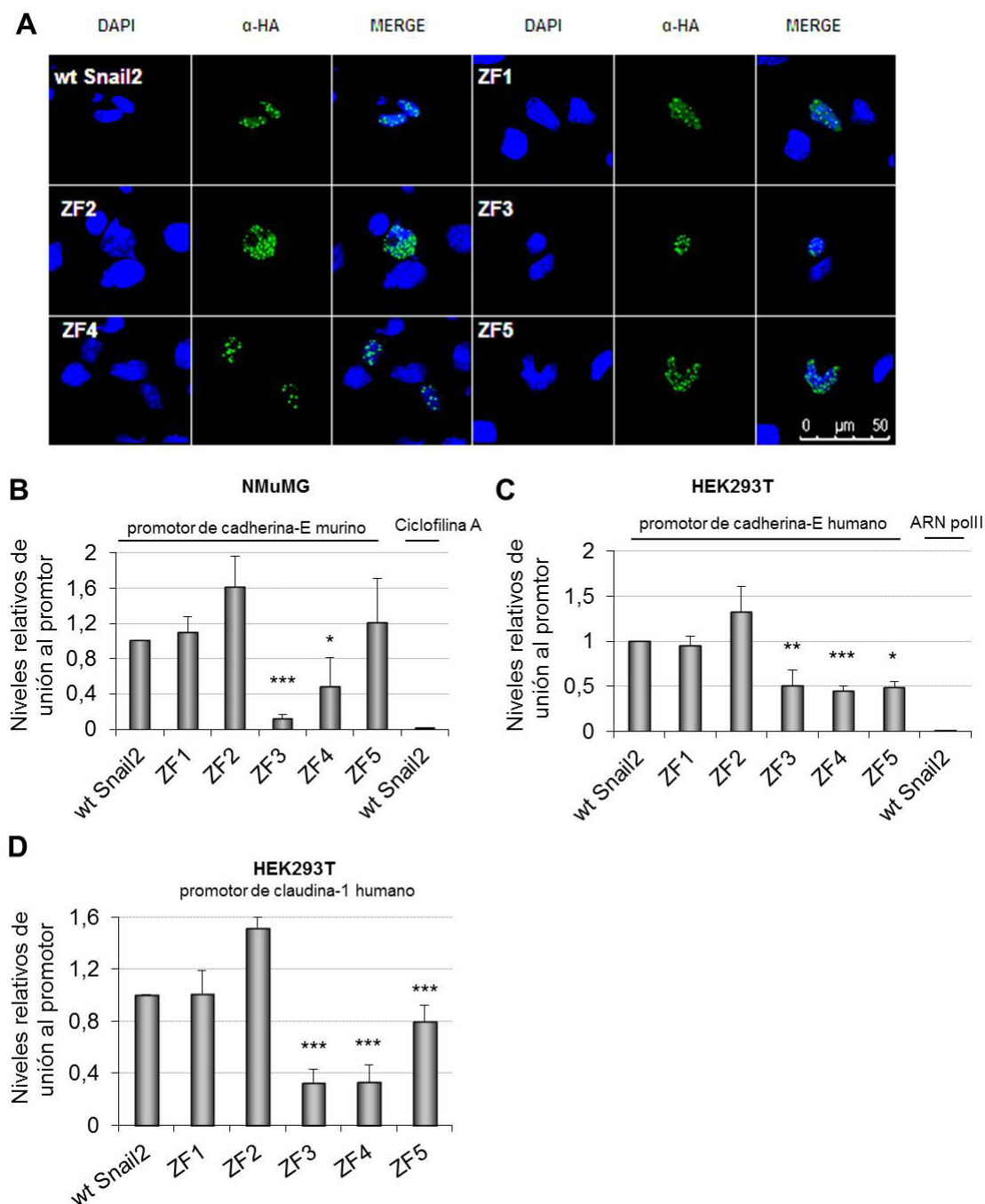


Figura 36. Localización celular y capacidad de unión al DNA de Snail2. (A) Localización subcelular de Snail2 y los mutantes de los ZFs indicados. Los núcleos están teñidos con DAPI. Escala: 50 μ m. (B) y (C) Ensayos de ChIP en las células NMuMG (B) y HEK293T (C) transfectadas con Snail2 y los mutantes de los ZFs indicados. (D) Ensayo de ChIP en células HEK293T para detectar la unión al promotor de *claudina-1* humano de Snail2 y los mutantes indicados. Después de la amplificación de la secuencia del promotor, la unión se midió como veces de inducción relativo al input. Los datos muestran la media \pm d.s. de 3 experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Para determinar la capacidad de unión de los diferentes mutantes de Snail2 a los promotores de *cadherina-E* humanos y murino se realizaron ensayos de ChIP en células HEK293T y NMuMG, respectivamente (Figura 36B y C). Los resultados obtenidos mostraron una marcada pérdida de la unión de los mutantes ZF3 y ZF4 de Snail2 a ambos promotores endógenos (Figura 36B y C), confirmando los resultados obtenidos en los ensayos de promotor. Además, se observó que el mutante ZF5 de Snail2 pierde también la capacidad unión al promotor de *cadherina-E* humano, de forma similar a los mutantes ZF3 y ZF4 (Figura 36C), aunque es capaz de mantener una represión parcial (Figura 35B). Sin embargo, no se observó pérdida de unión ni de capacidad represora del mutante ZF5 al promotor de *cadherina-E* murino (Figura 35A y 36B). Para verificar estos resultados, se analizó la unión de los diferentes mutantes de Snail2 al promotor de *claudina-1* humano, obteniéndose resultados similares a los mostrados anteriormente con el promotor de *cadherina-E* humano (Figura 35C y Figura 36D).

Estos resultados muestran un papel predominante de ZF3 o ZF4 de Snail2 en su capacidad de unión y actividad de represión, así como una contribución parcial de ZF2 y ZF5 en promotores humanos. Los datos obtenidos, junto con los correspondientes de Snail1, indican una contribución diferencial de los ZFs individuales de Snail1 y Snail2 a la actividad funcional de ambos factores.

2.3. Contribución de la organización de las cajas-E de los promotores de *cadherina-E* a la represión mediada por Snail1 y Snail2.

Estudios previos del laboratorio habían descrito el papel esencial del elemento E-pal del promotor de *cadherina-E* murino para la actividad represora de Snail1 y Snail2 (Cano et al., 2000; Bolos et al., 2003), mientras que estudios de otros grupos mostraron el requerimiento de las tres cajas-E del promotor humano para dicha represión (Batlle et al, 2000, Comijn et al., 2001, Hajra et al., 2002). En el presente trabajo nos propusimos profundizar en la relevancia individual de las cajas-E tanto en el promotor humano como murino de *cadherina-E*. Para ello, se generaron mutantes en las diferentes cajas-E de ambos promotores mediante la sustitución de la primera y última posición, citosina y guanina, respectivamente, por adeninas (**CAGGTG**-->**AAGGTA**), y se analizó la capacidad de Snail1 y Snail2 de reprimir los promotores mutantes. En el caso del promotor murino, se observó que la destrucción de cualquiera de las tres cajas-E de forma individual no afectaba a la capacidad represora de Snail1 o Snail2, a diferencia de lo observado con el mutante E-pal (Figura 37A), por lo que podemos concluir que son prescindibles individualmente.

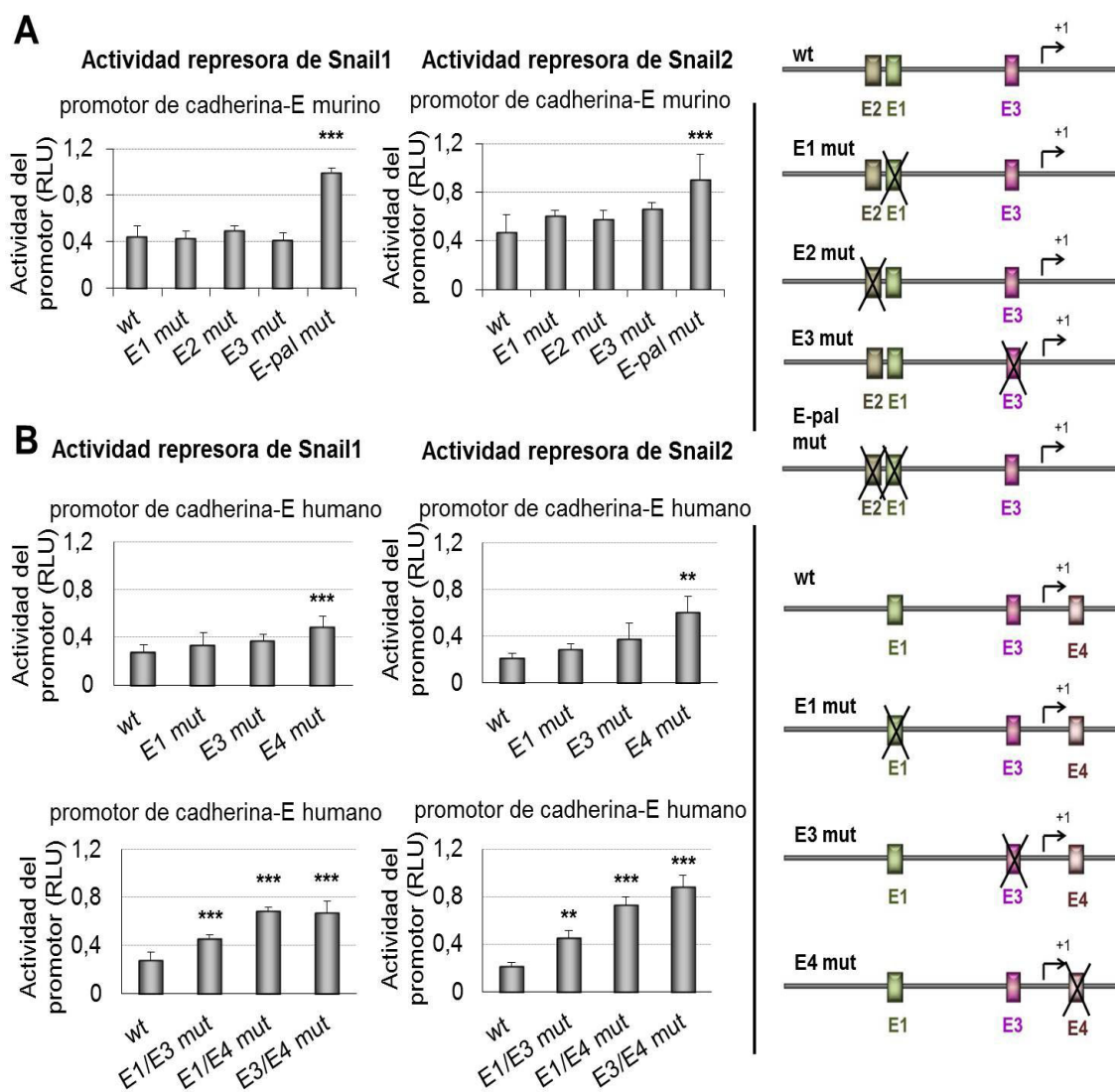


Figura 37. Análisis de la relevancia de las cajas-E del promotor de *cadherina-E* para la actividad represora de Snail1 y Snail2. (A) Actividad represora de Snail1 y Snail2 sobre el promotor de cadherina-E murino (wt) y las construcciones con las cajas-E indicadas mutadas según se presenta en los esquemas de la derecha del promotor murino. (B) Actividad represora de Snail1 y Snail2 sobre el promotor de cadherina-E humano (wt) y las construcciones con las cajas-E indicadas mutadas según se presenta en los esquemas de la derecha del promotor humano. La actividad (RLU) está normalizada con la que muestran las células transfectadas con el vector control pcDNA3 (datos no mostrados). Los datos representan la media \pm d.s. de cinco experimentos con triplicados para cada condición. Los esquemas de la derecha muestran la estructura de los promotores utilizados wt y los respectivos mutantes. ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Los estudios sobre el promotor de *cadherina-E* humano mostraron que la mutación individual de la cajas-E1 o -E3 no afectaba a la función de Snail1, pero la destrucción de la caja-E4 originó una pérdida parcial significativa de actividad represora de Snail1 y de Snail2 (Figura 37B). El estudio de diferentes combinaciones de mutantes en las cajas-E del promotor de *cadherina-E* humano mostró que la actividad represora de Snail1 y Snail2 se afectaba de modo significativo cuando la caja-E1 o -E3 se destruye junto con la caja-E4, y en menor medida por la mutación

combinada las cajas-E1 y -E3 (Figura 37B). Estos resultados indican que se necesita la destrucción de dos cajas-E en el promotor humano para observar una pérdida significativa de actividad represora de Snail1 y Snail2, mientras que la presencia de una única caja-E es suficiente para mantener una represión parcial por ambos factores (Figura 37B).

En conjunto, los datos obtenidos indican que la distribución de las cajas-E de los promotores diana de Snail1 y Snail2 es un factor adicional que contribuye a la eficiencia de la represión mediada por ambos factores.

2.4. Contribución de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2 al proceso de TEM.

Una vez identificados los ZFs de Snail1 y Snail2 necesarios para la represión y unión a los promotores de *cadherina-E* y *claudina-1*, nos propusimos estudiar la capacidad de los mismos para inducir TEM. Para ello, generamos, en las células epiteliales MDCK-II, líneas estables que expresan las formas silvestres de ambos factores, Snail1-HA o Snail2-HA, o los mutantes identificados en los correspondientes ZFs como necesarios para la represión por ambos factores; es decir, ZF1, ZF2 y ZF1/ZF2 de Snail1, y ZF3 y ZF4 de Snail2. Las líneas estables MDCK-Snail1-HA y MDCK-Snail2-HA, caracterizadas previamente en el laboratorio, sufren un proceso de TEM con pérdida de marcadores epiteliales como la cadherina-E y aumento concomitante de marcadores mesenquimales como cadherina-N, fibronectina y vimentina (Cano et al., 2000; Bolos et al., 2003; Peinado et al., 2004b; Molina-Ortiz et al., 2012).

Al analizar el efecto de la expresión estable de los mutantes ZF1 o ZF2 de Snail1 se observó que se origina una TEM parcial, ya que los transfectantes correspondientes presentan características tanto de células epiteliales como mesenquimales, con un fenotipo variable entre clones (Figura 38A, c-e y k). El análisis de la expresión de marcadores determinó que la mayoría de los clones ZF1 y ZF2 presentaban una alta expresión de cadherina-E, aunque con niveles variables entre los clones (Figura 38B) y una localización parcial en los contactos célula-célula (Figura 38A, h-j y o), bajos niveles de vimentina y niveles variables de otros marcadores mesenquimales, como cadherina-N y fibronectina (Figura 38B). Significativamente, los clones que presentaban una mayor expresión de los mutantes Snail1, como ZF1#5 y ZF2#6, originan un fenotipo de TEM mas atenuado, comparado con los clones ZF1#4 y ZF2#4, que expresan menores niveles (Figura 38A y B). Sin embargo, la expresión estable del doble mutante ZF1/ZF2 de Snail1 originó un claro fenotipo epitelial en todos los clones analizados (Figura 38A, l-n), con altos niveles de cadherina-E organizada en los contactos célula-célula, y baja o nula expresión de marcadores mesenquimales (Figura 38A, p-r y 38B), sugiriendo que ZF1 y ZF2 de Snail1 se requieren para una inducción eficiente de TEM.

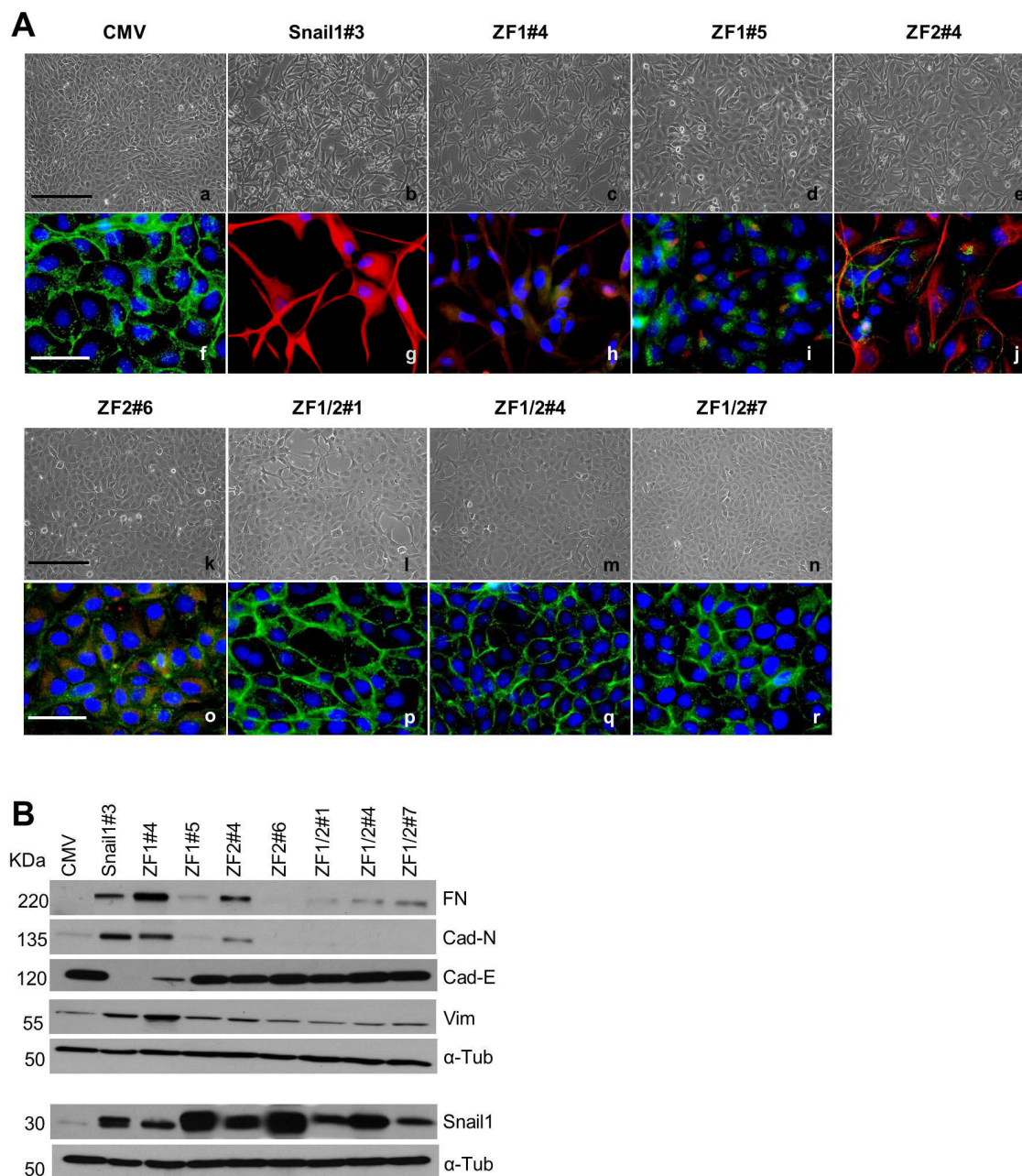


Figura 38. Estudio del requerimiento de los ZFs de Snail1 para su capacidad de inducir TEM. (A) Caracterización fenotípica de un clon representativo de Snail1-HA, dos clones de Snail1-ZF1 (#4 y #5) y Snail1-ZF2 (#4 y #6), y tres clones de Snail1-ZF1/2 (#1, #4, y #7) comparado con los clones control MDCK-CMV establemente transfectados. Los paneles a-e y k-n son imágenes de contraste de fases, mientras que los paneles f-j y o-r corresponden a imágenes representativas de inmunofluorescencias para cadherina-E (verde) y vimentina (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: paneles a-e y k-n, 600 μ m; f-j y o-r, 300 μ m. **(B)** Western-blot de los niveles de cadherina-E (Cad-E), fibronectina (FN), cadherina-N (Cad-N) y vimentina (Vim) en el panel superior, y niveles de Snail1-HA y los mutantes en el panel inferior en los clones MDCK-II indicados establemente transfectados. α -Tubulina se utilizó como control de carga.

Complementariamente, se llevó a cabo el mismo tipo de estudio para los mutantes ZF3 y ZF4 de Snail2 (Figura 39). Los resultados mostraron que la expresión estable de cualquiera de

los dos mutantes impide la inducción de TEM. Todos los clones generados mantienen el fenotipo epitelial con altos niveles de cadherina-E, organizada en los contactos célula-célula, y ausencia o bajos niveles de marcadores mesenquimales (Figura 39A y B).

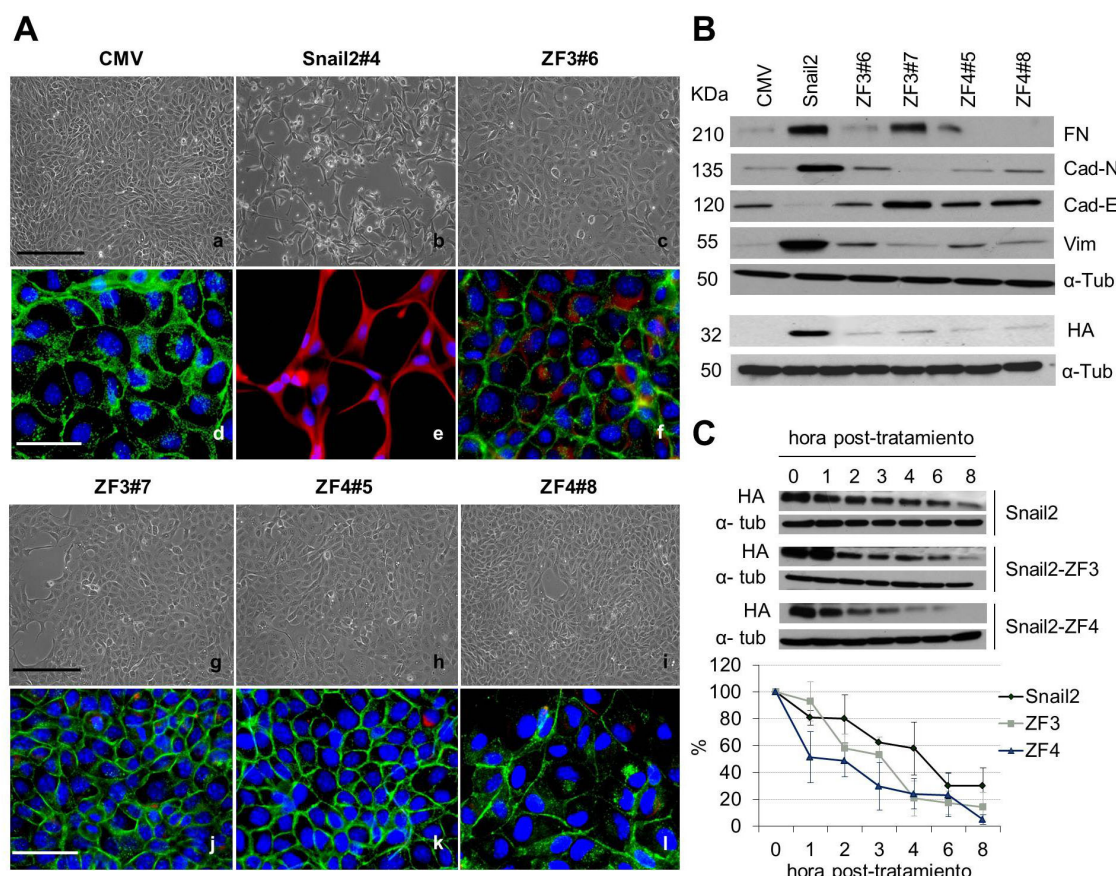


Figura 39. Estudio del requerimiento de los ZFs de Snail2 para su capacidad de inducir TEM. (A) Caracterización fenotípica de un clon representativo de Snail2-HA, dos clones de Snail2-ZF3 (#6 y #7) y dos clones representativos de Snail2-ZF4 (#5 y #8) comparado con los clones control MDCK-CMV establemente transfectados. Los paneles a-c y g-i son imágenes de contraste de fases, mientras que los paneles d-f y j-l son imágenes representativas de inmunofluorescencias para cadherina-E (verde) y vimentina (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: paneles a-c y g-i, 600 μ m; d-f y j-l, 300 μ m. (B) Western-blot de los niveles de cadherina-E (Cad-E), fibronectina (FN), cadherina-N (Cad-N) y vimentina (Vim) en el panel superior, y niveles de Snail2-HA y los mutantes indicados en el panel inferior en los clones MDCK-II establemente transfectados. α -Tubulina se utilizó como control de carga. (C) Estabilidad de Snail2 y los mutantes en los ZFs indicados en células HEK293T tratadas con cicloheximida durante el tiempo indicado. El panel superior muestra western-blots de los niveles de Snail2-HA y los mutantes ZF3 y ZF4 de un experimento representativo. α -Tubulina fue utilizada como control de carga. En la parte inferior se muestra la cuantificación densitométrica de la cantidad relativa de Snail2-HA y los mutantes de los ZF3 y ZF4 a los tiempos indicados. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes \pm d.s.

De forma destacada, se observó que los mutantes ZF3 y ZF4 de Snail2 se expresan a bajos niveles en todos los clones analizados (Figura 39B), sugiriendo que estas mutaciones podrían originar inestabilidad de Snail2. Para verificar esta hipótesis se analizó la vida media de las formas mutantes de Snail2 en experimentos de pulso-caza con cicloheximida. Los resultados mostraron

que la vida media de los mutantes ZF3 y ZF4 (aproximadamente 3 y 2 horas, respectivamente) es inferior a la de Snail2 silvestre (5 horas) (Figura 39C).

Estos resultados confirman la relevancia *in vivo* de los ZFs de Snail1 y Snail2 identificados como esenciales para la actividad represora tanto en los estudios de modelación tridimensional como en los estudios *in vitro* e *in vivo* con los promotores de *cadherina-E* y *claudina-1*, y apoyan la contribución diferencial de ZFs específicos de Snail1 (ZF1 y ZF2) y Snail2 (ZF3 y ZF4) en su actividad biológica.

2.5. Contribución de los dominios SNAG y SLUG de Snail2 al proceso de TEM.

Estudios previos demostraron que el dominio SNAG de Snail1 es imprescindible tanto para la capacidad de represión de *cadherina-E* como para inducir TEM *in vivo* (Batlle et al., 2000; Peinado et al., 2004b; Lin et al., 2010a), pero se desconocía si ocurre lo mismo en el caso de Snail2. Estudios previos del laboratorio habían mostrado el requerimiento de los dominios SNAG y SLUG para la capacidad de represión de Snail2 (Molina-Ortiz, 2010), y por ello nos propusimos analizar su contribución en la inducción de TEM *in vivo*. Para tal fin, generamos clones de las células epiteliales MDCK-II que expresaban establemente Snail2-HA o mutantes de delección de los dominios SNAG o SLUG (Δ SNAG-HA o Δ SLUG-HA). La delección del dominio SNAG de Snail2 impide la inducción de TEM (Figura 40A, c, f, g, j y 40B), tal como se había descrito para Snail1. Por el contrario, la expresión estable del mutante Δ SLUG-HA dio lugar a clones que llevan a cabo un proceso de TEM, con pérdida completa de *cadherina-E* y aumento de la expresión de vimentina y *cadherina-N* (Figura 40A, h, i, k, l y 40B). Al analizar los niveles de proteína Snail2 expresada en los clones con expresión estable de Snail2-HA, Δ SNAG-HA y Δ SLUG-HA, se observaron altos niveles del mutante Δ SLUG-HA relativos a la forma silvestre Snail2-HA y niveles casi indetectables del mutante Δ SNAG-HA (Figura 40C). Los bajos niveles de Snail2-HA en los clones correspondientes está de acuerdo con observaciones previas (Bolos et al., 2003). Los bajos niveles de expresión del mutante Δ SNAG-HA observados podrían ser indicativo de inestabilidad proteica. Para verificar esta hipótesis se analizó la vida media de las formas silvestre y mutantes de Snail2 en experimentos de pulso-caza con cicloheximida. Los resultados mostraron que la vida media del mutante Δ SNAG-HA (2 horas) es notablemente inferior a la vida media de Snail2 silvestre (5 horas) y a la del mutante Δ SLUG-HA (4 horas) (Figura 40D).

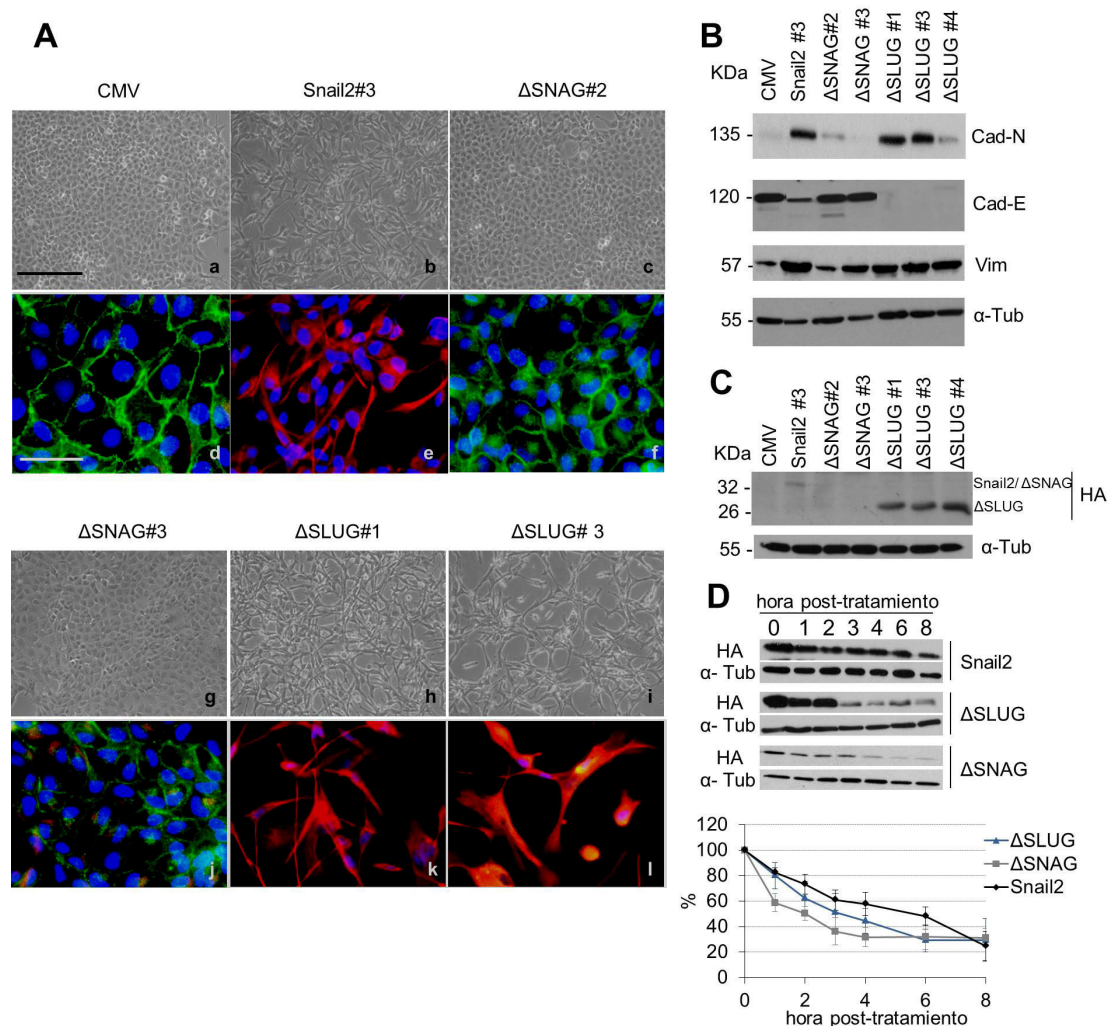


Figura 40. Estudio del requerimiento de los dominios SNAG y SLUG de Snail2 para su capacidad de inducir TEM. (A) Caracterización fenotípica de un clon representativo de Snail2-HA, dos clones de Snail2- Δ SNAG (#2 y #3) y dos de Snail2- Δ SLUG (#1 y #3) comparado con los clones control MDCK-CMV establemente transfectados. Los paneles a-c y g-i corresponden a imágenes de contraste de fases, mientras que los paneles d-f y j-l son imágenes representativas de inmunofluorescencias para cadherina-E (verde) y vimentina (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: paneles a-c y g-i, 600 μ m; paneles d-f y j-l, 300 μ m. (B) Western-blot de los niveles de cadherina-E (Cad-E), cadherina-N (Cad-N) y vimentina (Vim) de los clones indicados. (C) Western blot de los niveles de Snail2-HA y los mutantes indicados en los clones MDCK establemente transfectados. α -Tubulina se utilizó como control de carga. (D) Estabilidad de Snail2 y los mutantes Δ SNAG y Δ SLUG en células HEK293T tratadas con cicloheximida durante el tiempo indicado. El panel superior muestra los western-blots de los niveles de Snail2-HA y los mutantes Δ SNAG y Δ SLUG de un experimento representativo. α -Tubulina fue utilizada como control de carga. En la parte inferior se muestra la cuantificación densitométrica de la cantidad relativa de Snail2-HA, Snail2- Δ SNAG y Snail2- Δ SLUG a los tiempos indicados. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes \pm d.s.

2.6. Relevancia de la fosforilación de la serina 4 de Snail2 al proceso de TEM.

Tal y como se ha descrito en la Introducción, se conoce con cierto detalle el papel de la fosforilación en determinados residuos de Snail1 sobre su actividad funcional (Zhou et al., 2004; Yook et al., 2005; Du et al., 2010; MacPherson et al., 2010; Zhang et al., 2012; Mingot et al., 2013). En el caso de Snail2, la información de que se dispone sobre su regulación por fosforilación es considerablemente menor. Estudios previos del laboratorio identificaron la fosforilación *in vivo* de la serina 4 y la serina 88 de Snail2 (Molina-Ortíz, P., 2010), pero se desconocía el papel regulador que jugaban dichas fosforilaciones. Por ello nos propusimos estudiar su papel en la actividad funcional de Snail2, centrándonos en la fosforilación de la serina 4 debido a que esta serina se encuentra en el dominio regulador SNAG, que ha sido descrito recientemente como relevante para la exportación nuclear de Snail1 (Mingot et al., 2013). Con este objetivo, se generó un mutante no fosforilable (S4A) y otro fosfomimético (S4D) de Snail2, y posteriormente se analizó su capacidad de inducir TEM en células MDCK-II. Los clones que expresaban de forma estable el mutante no fosforilable Snail2-S4A presentaban un fenotipo mesenquimal similar al de los clones Snail2 silvestre a baja confluencia. Sin embargo, dichos clones mantienen altos niveles de cadherina-E, parcialmente organizada en los contactos célula-célula, a alta densidad, y presentan niveles moderados o bajos de vimentina, fibronectina y cadherina-N (Figura 41A, a-f, g-j y 41B), sugiriendo que habían llevado a cabo una TEM parcial. Por el contrario, la expresión estable del mutante fosfomimético Snail2-S4D induce un fenotipo completamente mesenquimal acompañado de la pérdida total de cadherina-E y aumento de los niveles de vimentina, cadherina-N y fibronectina (Figura 41A, h, i, k, l y 41B). Se observaron diferentes niveles de expresión de Snail2-S4A entre los clones analizados y niveles similares entre los clones S4D, ligeramente superiores a los clones Snail2-HA silvestre (Figura 41C). El análisis de la actividad del promotor de *cadherina-E* en los diferentes clones estables mostró que la capacidad represora de Snail2-S4A era mucho menor que la de Snail2 silvestre mientras que la capacidad represora del mutante Snail2-S4D era significativamente superior a la de Snail2 (Figura 41D). Estas diferencias en la capacidad represora podrían deberse a diferencias en los niveles de estabilidad de cada variante de Snail2, o bien a diferentes afinidades en la unión a DNA o a co-represores.

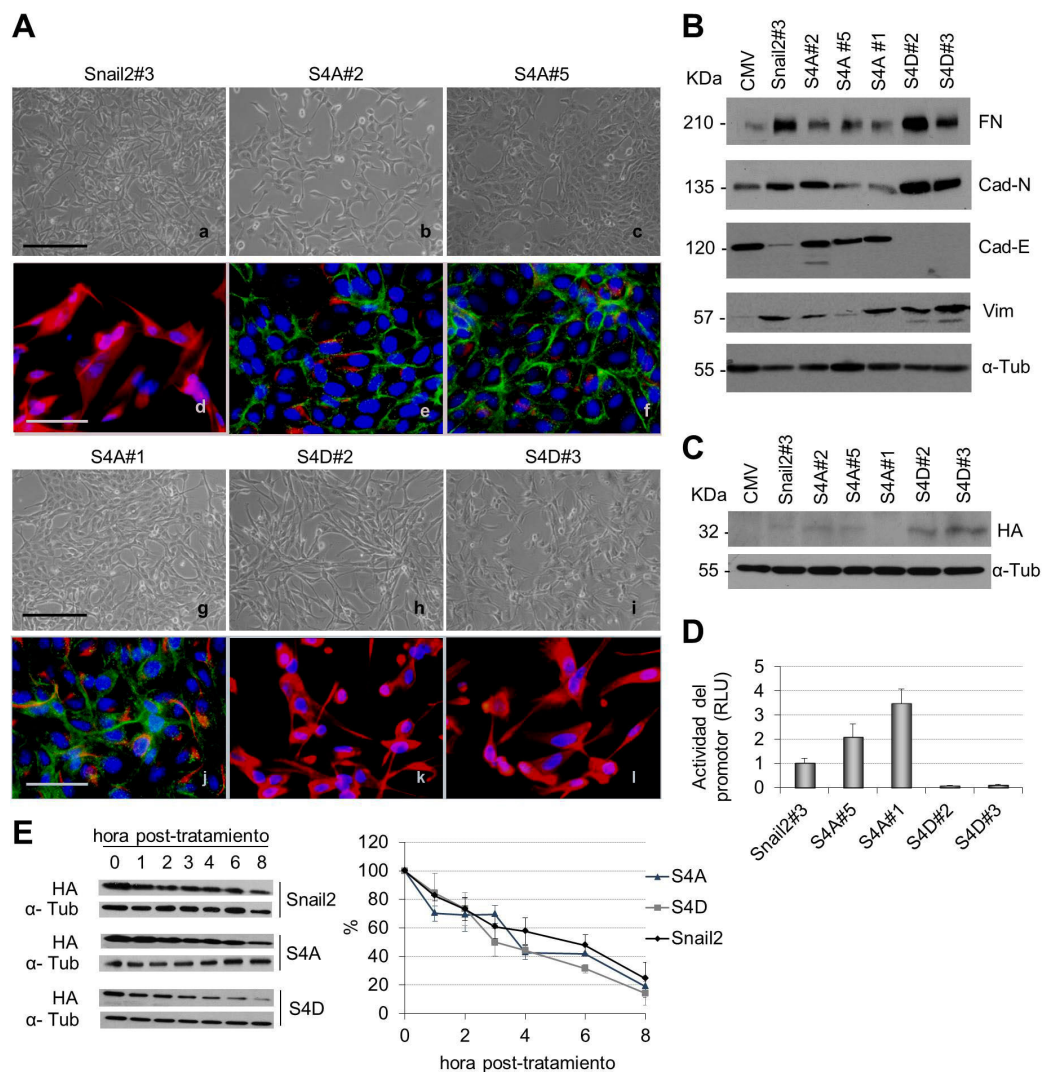
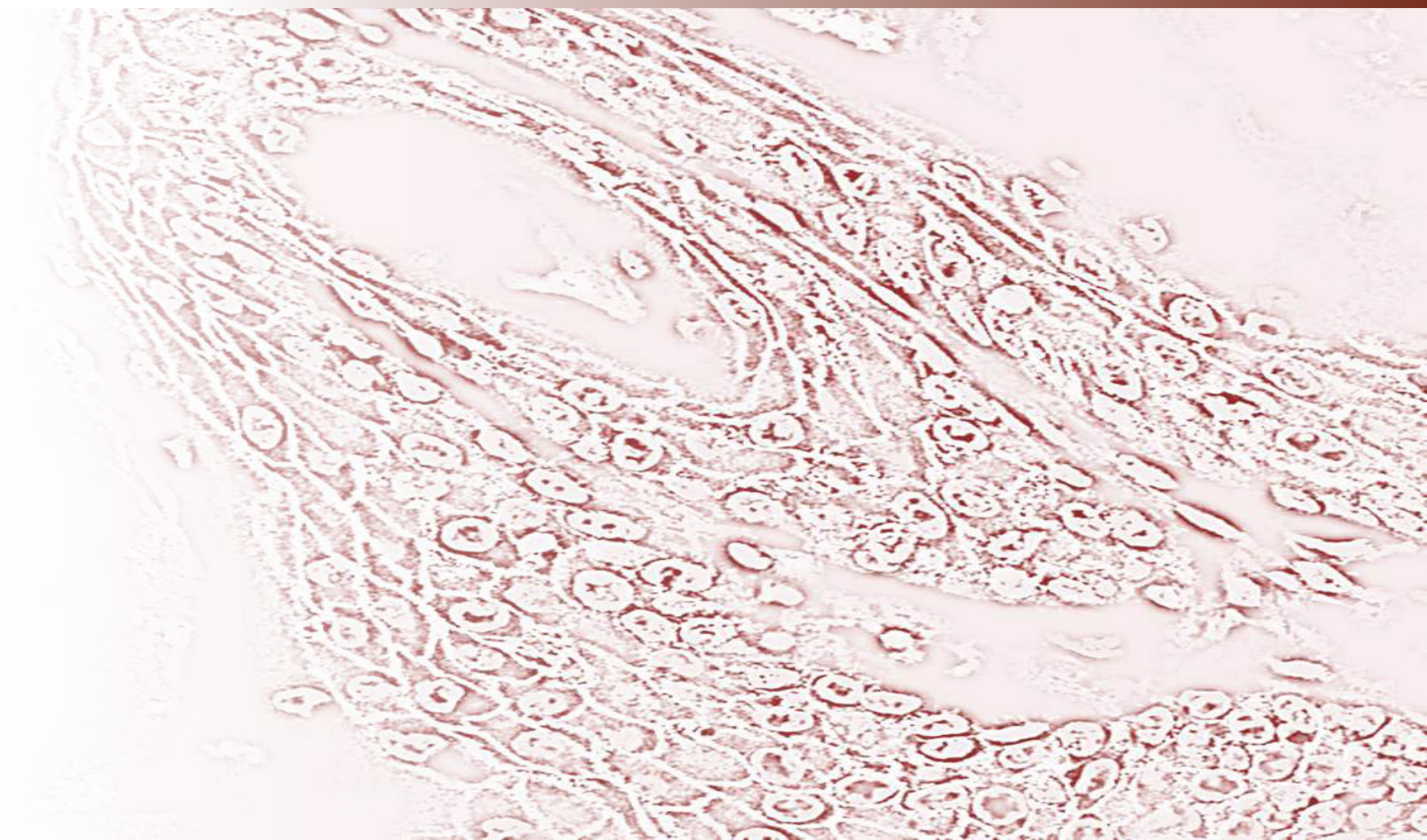


Figura 41. Estudio de la influencia de la fosforilación de la serina 4 de Snail2 para su capacidad de inducir TEM. (A) Caracterización fenotípica de un clon representativo de Snail2-HA, tres clones de Snail2-S4A (#2, #5 y #1) y dos de Snail2-S4D (#2 y #3) comparado con los clones control MDCK-CMV establemente transfectados. Los paneles a-c y g-i son imágenes de contraste de fases, mientras que los paneles d-f y j-l son imágenes representativas de inmunofluorescencias para cadherina-E (verde) y vimentina (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: paneles a-c y g-i, 600 μ m; paneles d-f y j-l, 300 μ m. (B) Western-blots de los niveles de cadherina-E (Cad-E), cadherina-N (Cad-N), fibronectina (FN) y vimentina (Vim) de los clones indicados. α -Tubulina se utilizó como control de carga. (C) Western blot de los niveles de Snail2-HA y los mutantes indicados en los clones MDCK establemente transfectados. α -Tubulina se utilizó como control de carga. (D) Actividad represora de los clones indicados sobre el promotor de *cadherina-E*. La actividad (RLU) se normalizó respecto a la que presenta el clon Snail2-HA. Los resultados muestran dos experimentos con triplicados para cada condición, representándose la media \pm d.s. (E) Estabilidad de Snail2 y los mutantes S4A y S4D en células HEK293T tratadas con cicloheximida durante el tiempo indicado. El panel izquierdo muestra los western-blots con los niveles de Snail2-HA y los mutantes S4A y S4D de un experimento representativo. α -tubulina fue utilizada como control de carga. En la parte derecha se muestra la cuantificación densitométrica de la cantidad relativa de Snail2-HA, Snail2-S4A y Snail2-S4D a los tiempos indicados. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes \pm d.s.

Para analizar la estabilidad proteica, se realizaron ensayos de pulso-caza con cicloheximida de los diferentes mutantes. Los resultados obtenidos mostraron que los mutantes Snail2-S4A y Snail2-S4D tienen una vida media similar, aproximadamente de 4 horas, ligeramente inferior a la que presenta Snail2-HA (Figura 41E), descartando por tanto alteraciones en la vida media como responsables de la mayor actividad represora del mutante Snail2-S4D. Datos previos del laboratorio mostraron que el mutante Snail2-S4D presenta una mayor localización nuclear que la forma salvaje (Molina-Ortiz, P., 2010), sugiriendo que la fosforilación de la serina 4 disminuye la exportación nuclear de Snail2, tal como se ha mostrado recientemente para Snail1 (Mingot et al., 2013).

En su conjunto, estos datos indican que se requiere la integridad de la serina 4 de Snail2 para inducir TEM, y que su fosforilación favorece la capacidad represora de Snail2.



1. Caracterización del papel de *Snail2* en la homeostasis de la piel de ratón: regulación del folículo piloso y respuesta a carcinogénesis química.

1.1. Contribución de *Snail2* en el ciclo del folículo piloso.

Datos previos del laboratorio mostraron que *Snail2* se expresa en el FP, siendo particularmente más abundante en la región prominente. Además, en dicho estudio se observó que en los ratones *Snail2*^{-/-} la localización de células madre del FP identificadas como “label retaining cells” (LRC) no estaba restringida únicamente a la región prominente, tal como ocurre en los ratones *Snail2*^{+/+}, sino que había un aumento en su número y con una distribución más amplia en el FP (Molina-Ortiz et al., 2010). Para profundizar en el papel de *Snail2* en el ciclo del FP, decidimos analizar la respuesta al estímulo de la rasuración en las tres primeras telogenes sincrónicas del periodo post-natal en ratones *Snail2*^{-/-}, en comparación a ratones control y heterocigotos.

Los resultados de este análisis mostraron que la delección de *Snail2* origina una aceleración en el crecimiento del pelo en la primera y segunda telogén (Figura 11). El estudio de las muestras de piel obtenidas nos permitió determinar que, además, existe un mayor estado proliferativo en la epidermis de los ratones *Snail2*^{-/-} (Figura 13B). Estos resultados contrastan con los de otro estudio previo que había determinado que en ratones *Snail2*^{-/-} recién nacidos, el oscurecimiento de la piel y la aparición del pelo sufren un retraso respecto a ratones *Snail2*^{+/+} (Parent et al., 2010), si bien, en dicho estudio no se analizaron posibles alteraciones, más allá de la morfogénesis de pelo durante el desarrollo embrionario, en los ciclos normales del FP en el periodo post-natal. Un dato a destacar de los resultados obtenidos en el presente estudio es que la telogén afectada por la delección de *Snail2* es la refractaria y no la competente. Ambas telogenes están reguladas por diferentes vías de señalización, por lo tanto, el hecho de que únicamente se vea afectada la telogén refractaria indica que *Snail2* está implicado en vías de señalización que afectan al control de esta telogén. La transición telogén-anagén está controlada por, al menos, factores BMPs, FGF, TGF-β y la vía de Wnt/β-catenina (Plikus et al., 2008; Plikus, 2012; Choi et al., 2013; Deschene et al., 2014). De esta manera, factores inhibitorios del crecimiento como BMP, así como los niveles de FGF18, se incrementan en la telogén refractaria, mientras que vías activadoras como Wnt y TGF-β están inhibidas. Sin embargo, en la telogén competente, los niveles de BMPs y FGF18 disminuyen, y va aumentando la señalización por Wnt, FGF7 y TGF-β (Blanpain et al., 2004; Plikus et al., 2008; Greco et al., 2009; Hsu et al., 2011; Plikus, 2012; Oshimori and Fuchs, 2012; Kimura-Ueki et al., 2012). Por tanto, es posible que en los ratones *Snail2*^{-/-} exista un defecto en la señalización mediada por BMPs o bien en la vía de Wnt/β-catenina. En la epidermis del ratón adulto, la activación de la vía de Wnt/β-catenina se restringe a linajes del FP y células mesenquimales de la papila dermal

(Rendl et al., 2005; Enshell-Seijffers et al., 2010). En este trabajo hemos analizado los niveles de expresión de β -catenina en los FPs de los ratones *Snail2*^{-/-} debido a la relación directa descrita entre la deslocalización de β -catenina con la entrada en anagén, en la que se produce un incremento de localización nuclear y citoplasmática que implica un aumento de proliferación y desarrollo del FP, así como otros eventos como la diferenciación de adipocitos de la dermis (Choi et al., 2013; Donati et al., 2014; Lien et al., 2014; Deschene et al., 2014). Los resultados obtenidos indican que los niveles de β -catenina en ratones *Snail2*^{-/-} se encuentran aumentados, y con una mayor localización citoplásmica-nuclear, respecto a los FPs de los ratones *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{+/+} (Figura 13A). Por lo tanto, los datos sugieren que *Snail2* podría ser un regulador negativo de la entrada en anagén a través de su influencia en la vía Wnt y que, consecuentemente, su delección activa dicha vía y el crecimiento del pelo en la telogén refractaria. Como análisis adicional al realizado sería interesante comprobar los niveles de otras vías implicadas en el ciclo del FP, como los niveles de BMPs y de los factores FGF en ausencia de *Snail2*. De esta manera, podríamos determinar si *Snail2* también afecta a estas rutas, o por el contrario, los efectos observados son consecuencia exclusiva de la alteración de la vía de Wnt/ β -catenina. En este sentido, un estudio en *X. laevis* ha descrito que la pérdida de *Snail2* en la cresta neural origina un descenso de *bmp4* y *wnt8*, disminuye la expresión del inhibidor de la vía de Wnt, *frzb1*, y aumenta la de antagonistas de BMP4 (Shi et al., 2011), apoyando nuestros resultados.

Las células madre epidérmicas son cruciales para mantener la homeostasis de la piel. Como ya se ha mencionado en la Introducción, las células progenitoras transitorias (TA) de la capa basal se dividen de forma asimétrica dando lugar a una célula que entra en un programa de diferenciación terminal. De forma análoga, las células madre de la región prominente del FP se dividen para mantener la homeostasis del FP, y son capaces de movilizarse hacia otras estructuras de la epidermis. Estudios previos a este trabajo habían mostrado que el promotor de *Snail2* se encuentra activo tanto en la región prominente de células madre del FP como en células madre o progenitoras de la capa basal (Molina-Ortiz et al., 2010). Los resultados del presente estudio sugieren un papel dual de *Snail2* en ambos compartimentos de células madre, ya que su ausencia regula negativamente la proliferación de los queratinocitos en la EIF mientras que acelera el crecimiento y diferenciación del pelo en el FP.

Por último, otros estudios han mostrado que la movilización de las células madre y precursoras del FP durante la carcinogénesis química de piel contribuyen al desarrollo de las lesiones (Trempey et al., 2007; Malanchi et al., 2008; da Silva-Diz et al., 2013), por lo que nuestros resultados sugieren que la ausencia de *Snail2* podría ser un elemento regulador positivo en la

movilización de estas poblaciones y contribuir al desarrollo de dichas lesiones.

1.2. *Snail2* como protector frente al desarrollo de lesiones inducidas por DMBA/TPA.

Snail2 está implicado en diferentes tipos de cáncer y es un marcador de malignidad en algunos tipos tumorales (Cobaleda et al., 2007). En muestras humanas se asocia con recurrencia de cáncer de mama y metástasis (Martin et al., 2005), resistencia a quimioterapia y radioterapia en carcinoma de ovario (Elloul et al., 2005; Kurrey et al., 2009), invasión, metástasis en nódulos linfáticos y mal pronóstico en SCC (Uchikado et al., 2005), invasión y supervivencia global en adenocarcinoma de pulmón y mesoteliomas (Shih et al., 2005; Sivertsen et al., 2006), y metástasis distantes en melanoma (Gupta et al., 2005). No obstante, un estudio reciente plantea un papel oncosupresor para *Snail2* en estadios iniciales de melanoma (Caramel et al., 2013). Para profundizar en la caracterización de las funciones de *Snail2* en la carcinogénesis, en nuestro laboratorio se llevaron a cabo estudios de carcinogénesis química de piel de ratón mediante tratamiento con DMBA/TPA en ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-}. Los resultados obtenidos demostraron que este tratamiento inducía un incremento en el número de lesiones, en su tamaño y en el grado de malignidad en los ratones *Snail2*^{-/-} en relación a los ratones silvestres (Molina-Ortiz et al., 2010). Este comportamiento se puede relacionar con la respuesta observada en el FP en los ratones *Snail2*^{-/-}, ya que previamente se ha descrito que alteraciones en el comportamiento del FP se traducen en una respuesta anormal al protocolo de carcinogénesis química (Trempey et al., 2007; da Silva-Diz et al., 2013). Además, nuestros datos indican un papel anti-tumoral para *Snail2* en contextos como la carcinogénesis química, al igual que ya se ha descrito en estadios iniciales de melanoma (Caramel et al., 2013).

En el presente trabajo se han ampliado los estudios previos, incluyendo el análisis de la respuesta a DMBA/TPA de ratones *Snail2* heterocigotos. El análisis conjunto de los resultados mostró que los ratones *Snail2*^{+/+} tardan más tiempo en alcanzar el 100% de incidencia de lesiones y presentan una mayor latencia (Figura 14A). Además, los ratones *Snail2*^{-/-} presentan un número de lesiones inferior a los ratones *Snail2*^{+/+}, con un tamaño globalmente menor que las lesiones de los ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-}. De forma destacada, las lesiones de los ratones *Snail2*^{+/+} presentan un porcentaje de SCC notablemente inferior respecto a los otros genotipos (Figura 19B). Por lo tanto, los ratones heterocigotos de *Snail2* presentan una respuesta compleja a la carcinogénesis química, que sugiere un efecto dosis dependiente de *Snail2* en el desarrollo y progresión de las lesiones, en el que la presencia de un solo alelo protege frente al desarrollo de las lesiones, pero su ausencia absoluta desencadena un disparo del número y malignización de las lesiones comparado con los ratones *Snail2*^{+/+}. No obstante, estos datos contrastan con un trabajo previo

que caracterizó la respuesta de ratones nulos de *Snail2* a la carcinogénesis de piel inducida por radiación UV, mostrando un descenso de la carga y de la progresión tumoral comparado con ratones silvestres (Newkirk et al., 2007). Además, esta respuesta de los ratones *Snail2*^{-/-} a la radiación UV ha sido recientemente descrita como independiente de p53 (Perez et al., 2014), pese a la propuesta función de p53 en la regulación negativa de *Snail2* favoreciendo su degradación mediada por Mdm2 (Wang et al., 2009). Las diferencias con nuestros estudios se podrían deber a los diferentes fondos genéticos de los ratones utilizados en ambos estudios (Newkirk et al., 2008a; Shirley et al., 2010).

El análisis de marcadores de diferenciación en las lesiones generadas por carcinogénesis química en los tres genotipos *Snail2*, mostró que los papilomas desarrollados en los ratones heterocigotos muestran una mayor tendencia a la malignización, similar a la de las lesiones *Snail2*^{-/-}, y en contraste con las de los ratones *Snail2*^{+/+}, ya que observamos expresión de CK13 y CK8 en papilomas en mayor medida que en los correspondientes de los ratones *Snail2*^{+/+} (Figura 15). No obstante, el análisis del estado proliferativo de los papilomas provenientes de ratones *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{+/+} mostró que no existían diferencias significativas entre ambos (Figura 16). En los primeros estadios de la carcinogénesis química, el entorno tumoral genera señales que inducen la apoptosis de las células tumorales en un intento por evitar el crecimiento descontrolado de las mismas (Joyce and Pollard, 2009). El análisis del número de células apoptóticas mediante la técnica de TUNEL mostró que los papilomas de los ratones *Snail2*^{+/-} presentaban una tasa de apoptosis intratumoral incrementada respecto a los ratones *Snail2*^{+/+}, similar a lo observado en los ratones *Snail2*^{-/-} (Figura 16). Estos resultados sugieren que la ausencia total o parcial de *Snail2* está regulando el nivel de apoptosis, y está de acuerdo con el papel anti-apoptótico previamente descrito para *Snail2* *in vivo* e *in vitro* en respuesta a daño genotóxico (Perez-Losada et al., 2002; Perez-Losada et al., 2003; Kajita et al., 2004; Vitali et al., 2008). En su conjunto, los datos del análisis de proliferación y apoptosis pueden explicar el menor número y tamaño de lesiones de los ratones *Snail2*^{+/-}, ya que presentan un aumento en la tasas de apoptosis sin alteraciones en los niveles de proliferación. En resumen, los ratones muestran una menor carga tumoral con lesiones ligeramente inferiores en tamaño a los ratones *Snail2*^{+/+}, y presentan un porcentaje inferior de SCC, a pesar del aumento en la tendencia a la malignización de los papilomas *Snail2*^{+/-}, observado por el análisis de marcadores de diferenciación. Por tanto, estos resultados sugieren la existencia de mecanismos adicionales que impiden la progresión a SCC en el contexto de la deficiencia de un alelo de *Snail2*.

Estudios previos han demostrado que la vía Wnt/ β -catenina está implicada en progresión tumoral (Conacci-Sorrell et al., 2002). Por ejemplo, se ha observado que la delección de β -catenina origina la regresión completa de papilomas y previene la iniciación tumoral, mientras que esta vía se encuentra activada constitutivamente en los SCC (Malanchi et al., 2008). Basados en estos datos, decidimos analizar la expresión de β -catenina en las lesiones de los ratones *Snail2*^{+/+}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-}, observando una mayor localización citoplásmica y nuclear en las lesiones de los ratones *Snail2*^{-/-} respecto de los otros genotipos (Figura 17B). Estos resultados apoyan que la activación de la vía Wnt podría favorecer la progresión tumoral observada en las lesiones generadas en ausencia de *Snail2* (Liu et al., 2010). Por otra parte, el análisis de la vía de Notch1, esencial para la diferenciación epidérmica (Dotto, 2008; Watt et al., 2008), mostró una disminución en los niveles de *Jagged1* en las lesiones *Snail2*^{-/-}, de acuerdo al estado menos diferenciado de dichas lesiones. El menor grado de diferenciación de las lesiones *Snail2*^{-/-} también se apoya por el incremento de expresión de p63, observado previamente (Molina-Ortiz, P., 2010), si bien un estudio reciente ha descrito que la expresión de p63 en SCC cutáneos no se altera por *Snail1* ni por *Snail2* (Chen et al., 2013).

1.3. *Snail2* participa en la movilización de precursores hematopoyéticos: papel pro-tumoral del componente inflamatorio.

Los datos obtenidos con los experimentos de carcinogénesis química en los tres genotipos de ratones *Snail2* podrían ser el resultado de dos circunstancias no excluyentes. Por un lado, la movilización de células madre de los FPs de los ratones *Snail2*^{-/-} podría ser un factor clave en el mayor desarrollo de las lesiones observado en este genotipo respecto a controles y heterocigotos. Por otro lado, puesto que los queratinocitos *Snail2*^{-/-} no son capaces de proliferar *in vitro* y su proliferación *in vivo* se encuentra muy disminuida en otras condiciones o en respuesta a diversos estímulos, como hiperproliferación por TPA y cicatrización de heridas (Figura 8) (Savagner et al., 2005; Hudson et al., 2009; Molina-Ortiz, P., 2010; Quan et al., 2014), es probable que la progresión tumoral observada en los ratones *Snail2*^{-/-} sea debida a factores externos a los propios queratinocitos.

Un factor esencial en la progresión tumoral es la interacción entre las células tumorales y el microambiente, siendo el sistema inmune un elemento clave en el mismo. La respuesta inmune originada por la aparición de un tumor puede ser antitumorogénica e intentar, por lo tanto, eliminar las células cancerosas, o protumorogénica y potenciar el desarrollo del tumor (Coussens and Werb, 2002). Por ejemplo, células del linaje mielóide, como los macrófagos asociados a tumor de tipo 2 (TAM M2) (Allavena et al., 2008), neutrófilos (Fridlender et al., 2009) o células mieloides

inmaduras (IMC), clasificadas como subpoblación de precursores mieloides (Gabrilovich and Nagaraj, 2009), pueden promover el crecimiento tumoral.

En estudios previos del laboratorio se había observado que las lesiones *Snail2*^{-/-} presentaban un componente infamatorio anómalo (Molina-Ortiz, 2010), que podría estar relacionado con las alteraciones de la homeostasis hematopoyética descritas previamente en ratones *Snail2*^{-/-} (Inoue et al., 2002; Perez-Losada et al., 2003; Sun et al., 2010). Basados en estos datos, nos propusimos estudiar la influencia de *Snail2* en el sistema hematopoyético en el desarrollo y progresión de las lesiones inducidas por DMBA/TPA. En primer lugar, procedimos a analizar los tipos celulares integrantes del componente inflamatorio presentes en las lesiones de los ratones *Snail2*^{+/+}, *Snail2*^{+/-} y *Snail2*^{-/-}, encontrando un aumento significativo de la población de precursores mieloides CD11b⁺/Gr-1⁺, así como en las poblaciones de linfocitos B y T en las lesiones *Snail2*^{-/-} respecto a los otros dos genotipos (Figura 19). Este aumento también se observó en la médula ósea y en sangre periférica de los ratones *Snail2*^{-/-}. Con el fin de clarificar la contribución del sistema hematopoyético a la respuesta diferencial observada en los ratones *Snail2* en respuesta a la carcinogénesis química, llevamos a cabo experimentos de reconstitución de medula ósea, utilizando como aceptores tanto ratones *Snail2*^{+/+} como *Snail2*^{-/-}, y los sometimos al protocolo de carcinogénesis química. Los resultados mostraron que tanto el aumento del número de lesiones, como el tamaño, malignidad y aumento de precursores mieloides en los ratones *Snail2*^{-/-} es consecuencia de la ausencia de *Snail2* en los progenitores hematopoyéticos. De esta manera, ratones *Snail2*^{+/+}_MO-*Snail2*^{-/-} reprodujeron las características de los ratones *Snail2*^{-/-}, excepto el retraso de la latencia. Por otro lado, el comportamiento de ratones *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/+} imitó el fenotipo de ratones *Snail2*^{+/+} en cuanto al número de lesiones y porcentaje de precursores mieloides reclutados/movilizados, y también apoya el concepto de la importancia de la ausencia de *Snail2* en la epidermis en el parámetro de latencia, ya que no hay diferencias entre los ratones reconstituidos control y *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/+}. Adicionalmente, es importante destacar que los ratones *Snail2*^{-/-}_MO-*Snail2*^{+/-} desarrollaron una respuesta muy similar a los ratones *Snail2*^{+/-}, sugiriendo que los niveles o presencia de un único alelo de *Snail2* en los precursores hematopoyéticos protege frente al desarrollo de la respuesta a la carcinogénesis química.

La relevancia de los precursores mieloides en el modelo de carcinogénesis química ha sido analizada recientemente, y se ha descrito como una población promotora de la progresión tumoral (Di Piazza et al., 2012). Dicha progresión en este modelo se favorece mediante el aumento de la señalización de la vía de Wnt/ β -catenina al aumentar la secreción de ligandos o activadores de la vía que actúan sobre las células epiteliales vecinas (Di Piazza et al., 2012). Es importante

considerar que, en condiciones fisiológicas, no hay actividad de la vía Wnt/ β -catenina en células de la EIF, donde β -catenina presenta localización de membrana y no hay expresión de su coactivador Lef1 (Youssef et al., 2012). El hecho de que el nivel de β -catenina en las lesiones de los ratones *Snail2*^{-/-} se encuentre aumentado sugiere que la población mieloide puede estar favoreciendo la progresión de las lesiones *Snail2*^{-/-} activando la vía Wnt/ β -catenina. Por este motivo, decidimos analizar los niveles de ligandos de la vía (*Wnt3a*, *Wnt4* y *Wnt10a*) en las lesiones de ratones *Snail2*^{+/+} y *Snail2*^{-/-}. Este análisis mostró un aumento generalizado de todos ellos, siendo el más significativo el aumento de *Wnt4* (Figura 27A), ligando de la vía no canónica, aunque también se le atribuyen funciones en la vía canónica favoreciendo la localización nuclear de β -catenina (Tran et al., 2010; Thrassivoulou et al., 2013). Adicionalmente, los niveles de periostina, agonista de la vía de Wnt producido por células del estroma (Malanchi et al., 2012), también se encontraron aumentados en las lesiones *Snail2*^{-/-}. Todo ello confirma que hay un incremento de la vía de Wnt/ β -catenina en las lesiones *Snail2*^{-/-} comparadas con las procedentes de ratones *Snail2*^{+/+}, que se puede relacionar con las diferentes respuestas observadas entre los genotipos frente a la carcinogénesis química en cuanto a la progresión y desarrollo de las lesiones. Así, la respuesta que hemos observado en los ratones *Snail2*^{-/-}, se correlaciona con el papel descrito para los precursores mieloides en progresión tumoral en numerosos estudios (Sinha et al., 2007; Murdoch et al., 2008; Gao et al., 2009; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Di Piazza et al., 2012; Elinav et al., 2013). Los diferentes mecanismos por los que dichos precursores desencadenan la progresión tumoral incluyen el bloqueo de la diferenciación de células dendríticas; aumento de la respuesta inflamatoria protumoral (Gabrilovich et al., 1996; Cheng et al., 2008), interaccionando por ejemplo con macrófagos M1 o antitumorogénicos, y dirigiéndolos hacia un fenotipo M2 o protumorogénicos (Sinha et al., 2007); y bloqueo de la respuesta inmune inactivando la acción de los linfocitos B y T (Nagaraj and Gabrilovich, 2007). Por todo ello, sería de interés el análisis en profundidad de estas poblaciones de células inflamatorias, más allá del análisis por citometría de flujo que se ha realizado en este trabajo, en las lesiones de los ratones *Snail2*^{-/-} en comparación con las pertenecientes a los ratones *Snail2*^{+/+}.

1.4. Perspectiva global de la actuación de *Snail2* en la homeostasis epidérmica y hematopoyética.

Snail2 es un factor de TEM relacionado con progresión tumoral y quimioresistencia entre otros procesos (Nieto, 2011), pero sorprendentemente, los ratones *Snail2*^{-/-} muestran un mayor número de lesiones y de un mayor tamaño tras la carcinogénesis química. Observaciones previas a este trabajo describieron alteraciones en la respuesta inflamatoria en la carcinogénesis química de piel en los ratones *Snail2*^{-/-} (Molina-Ortiz, P., 2010). Adicionalmente, estudios de expresión génica

diferencial en la epidermis de ratones *Snail2*^{-/-} han descrito alteraciones en genes involucrados en respuesta a estímulos ambientales como por ejemplo descenso en la expresión de las cadenas γ y δ de los linfocitos T (Newkirk et al., 2008b), estando dicha disminución relacionada con un aumento en la susceptibilidad a la carcinogénesis de piel (Girardi et al., 2001). Basándonos en los resultados obtenidos en esta tesis, sugerimos que la ausencia de *Snail2* en los precursores hematopoyéticos provoca una acumulación de precursores mieloides, primero en la médula ósea, para luego distribuirse por el torrente sanguíneo y alcanzar las lesiones, favoreciendo su desarrollo, crecimiento y progresión a SCC, probablemente a través de la activación de la vía Wnt/ β -catenina (Figura 42). Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la relevancia del sistema inmune en progresión tumoral, y la existencia de diferencias en la respuesta a factores extrínsecos por parte de los queratinocitos de ratones *Snail2*^{-/-} (Newkirk et al., 2008b). Una gran variedad de estudios han demostrado la importancia de los precursores mieloides en el proceso tumoral y la generación del nicho metastásico (Psaila and Lyden, 2009; Gao and Mittal, 2009; Gabrilovich and Nagaraj, 2009), y según nuestros datos, *Snail2* puede ser un factor importante en su regulación, por lo que sería interesante estudiar en un futuro la expresión de *Snail2* en los diferentes etapas de la progresión tumoral en relación con la activación de precursores mieloides en otros sistemas.

Adicionalmente a la acción que pueden estar ejerciendo los precursores mieloides, la movilización de las células madre del FP podría contribuir al fenotipo observado después del tratamiento de carcinogénesis, por lo que proponemos un papel para *Snail2* en la movilización de dichas células, aunque su implicación tiene que ser estudiada en más detalle. En este contexto, se ha descrito el papel de *Snail2* en diferentes poblaciones de células madre, como por ejemplo, las de carcinoma de ovario (Kurrey et al., 2009) y de carcinomas escamosos de cabeza y cuello (HNSCC) (Chen et al., 2011), pero fundamentalmente se ha descrito su importancia en la glándula mamaria, siendo necesaria su expresión para el mantenimiento de las células madre de este tejido (Guo et al., 2012; Nassour et al., 2012; Phillips et al., 2014). Sin embargo, aunque las ratonas *Snail2*^{-/-} desarrollan de forma normal la glándula mamaria, no pueden secretar leche debido a fallos en la contracción de células basales mioepiteliales, relacionando así a *Snail2* con la arquitectura y homeostasis mamaria y defectos de su función (Phillips et al., 2014). En este mismo trabajo, describen que ratonas *Snail2*^{-/-}/MMTV-*Myc*⁺ no desarrollan tumores de mama de forma espontánea tal y como sucede en las ratonas *Snail2*^{+/-}/MMTV-*Myc*⁺ y *Snail2*^{-/-}/MMTV-*Myc*⁺, lo que indica que el papel de *Snail2* en tumorigénesis es en gran medida dependiente de tejido.

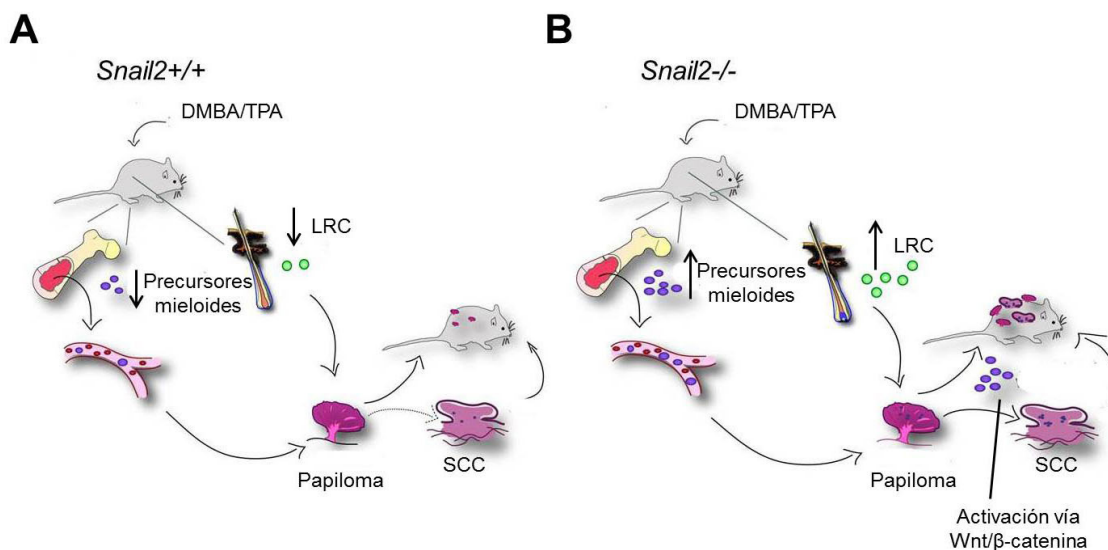


Figura 42. Esquema representativo de la respuesta de los ratones *Snail2* a la carcinogénesis química de piel. (A) Los ratones *Snail2*^{+/+} tratados con DMBA/TPA desarrollan fundamentalmente papilomas, y presentan un bajo porcentaje de precursores mieloides en médula ósea, sangre periférica y lesiones tumorales. (B) Los ratones *Snail2*^{-/-} desarrollan una gran cantidad de lesiones, con un alto porcentaje de SCC debido a que la ausencia de *Snail2* en el sistema hematopoyético produce la acumulación de precursores mieloides, lo que probablemente favorece la progresión tumoral mediante la activación de la vía Wnt/ β -catenina. Adicionalmente, las LRC, que en los ratones *Snail2*^{-/-} son mayores en número que en ratones *Snail2*^{+/+}, están deslocalizadas y podrían contribuir a la progresión tumoral.

Finalmente, estudios previos han analizado el papel que ejercen tanto *Snail1* como *Snail2* en los queratinocitos, y se ha descrito que poseen funciones en estas células a nivel de migración, inflamación y carcinogénesis, así como en procesos de diferenciación terminal (Sou et al., 2010). En el caso de *Snail1*, los estudios de carcinogénesis de piel se han llevado a cabo en un modelo de ratón de sobre-expresión en epidermis de este factor (Du et al., 2010b; De Craene et al., 2014). Dichos estudios han demostrado que las lesiones originadas en el modelo de sobre-expresión en la epidermis no sufren un proceso de TEM, sino que se produce una respuesta inflamatoria mediado por linfocitos $Ty\delta$ (Du et al., 2010b). No obstante, un trabajo más reciente muestra que la sobre-expresión de *Snail1* en epidermis origina la formación de carcinomas de forma espontánea y aumenta la metástasis cuando se combina con la pérdida de p53 (De Craene et al., 2014). En el presente trabajo hemos mostrado la importancia de la dosis génica de *Snail2* en la respuesta a la carcinogénesis química, por lo que sería interesante realizar el mismo tipo de abordaje de sobre-expresión para el caso de *Snail2*, y así comparar con lo observado en ratones que sobreexpresan *Snail1* en la epidermis.

2. Caracterización funcional de los dominios de unión a DNA de Snail1 y Snail2, y los dominios SNAG y SLUG de Snail2.

2.1. Divergencias entre Snail1 y Snail2: contribución diferencial de dedos de zinc equivalentes.

Snail1 y Snail2 son dos factores de transcripción con una homología del 87% en la región de unión al DNA. En vertebrados, este dominio está formado por cuatro (Snail1) y cinco (Snail2) dedos de zinc del tipo C_2H_2 (Grimes et al., 1996; Hemavathy et al., 2000; Barrallo-Gimeno and Nieto, 2009). Sin embargo, al inicio de esta tesis, las diferencias funcionales entre ambos dominios no eran conocidas. En este estudio hemos analizado, en primer lugar, de forma teórica, el modelo de reconocimiento (canónico o no canónico) que utilizan ambos factores para unirse al DNA, y nuestra predicción sugiere que es del tipo canónico, siendo los ZF3-ZF4 y ZF4-ZF5 de Snail1 y Snail2, respectivamente, los implicados en el reconocimiento de secuencias de tipo caja-E (Figura 28). Además, según esta predicción, los ZFs ZF1-ZF2 de Snail1 y ZF2-ZF3 de Snail2 serían capaces de establecer los contactos típicos con grupos fosfato que suelen ocurrir en ZFs canónicos y que estabilizan la unión al DNA (Wolfe et al., 2000; Pabo et al., 2001). Posteriormente, analizamos en profundidad la contribución individual de cada ZF de Snail1 y Snail2 en la organización tridimensional de los complejos Snail1/Snail2 en su interacción con el DNA (cajas-E), y su influencia en la capacidad de represión e inducción de TEM. Los resultados obtenidos confirman las predicciones teóricas, de manera que ambos factores se unen a una caja-E a través de los dos últimos ZFs de cada factor mediante interacciones entre bases específicas y los residuos de contacto, mientras que los ZF1 y ZF2 de Snail1, y los ZF2 y ZF3 de Snail2, establecen conexiones con grupos fosfatos del DNA (Figura 31). Los estudios funcionales realizados en ambos factores sobre represión de genes epiteliales con cajas-E así como de unión *in vivo* al DNA, confirmaron los resultados teóricos. Además, nuestros datos proporcionan la evidencia experimental que demuestra la falta de función del ZF1 de Snail2, confirmando así las propuestas teóricas previas de que el primer dedo de zinc no es funcional cuando la proteína tiene más de cuatro ZFs (Pavletich and Pabo, 1993; Sefton et al., 1998).

La simulación tridimensional de los mutantes de Snail1, junto con los estudios funcionales, apoya el papel esencial de los dedos ZF1 y ZF2 de Snail1 en la represión de promotores diana, de manera que mutaciones en esos dedos originarían una profunda alteración de la interacción con la caja-E que producirían la pérdida casi completa de unión del ZF3 y ZF4 con las bases correspondientes del DNA (Figura 32). No obstante, cabe destacar que los ensayos de promotor con Snail1 revelaron importantes diferencias entre el promotor humano y de ratón (Figura 33). Los ensayos con los promotores humanos de *cadherina-E* y *claudina-1* muestran que la mutación

individual de los dos primeros ZFs de Snail1 disminuye su actividad represora, aunque ambos mutantes tienen intacta la capacidad de unión al DNA, mientras que en el caso del promotor de *cadherina-E* murino los mutantes individuales en ZF1 y ZF2 mantienen la capacidad de represión de Snail1, así como su unión al DNA (Figuras 33 y 34). Estos resultados sugieren que la mutación en los dedos ZF1 o ZF2 de Snail1 promueve una conformación espacial que le impide reclutar la adecuada maquinaria de co-represores a los promotores humanos unidos. Relativo a los ZFs de Snail2 requeridos para su interacción con DNA y actividad represora, nuestros resultados ponen de manifiesto que los dedos ZF3 y ZF4, individualmente, son los únicos esenciales para la represión y unión a los promotores analizados. Los dedos ZF2 y ZF5 tienen una contribución menor o no significativa a la represión de los promotores humanos o murino (Figura 35). El modelo tridimensional elaborado está de acuerdo con los datos experimentales obtenidos, ya que la mutación del ZF3 o del ZF4 de Snail2 origina un fuerte desplazamiento de su interacción con la caja-E (Figura 32).

Adicionalmente, nuestros datos indican que la organización diferencial de las cajas-E en los promotores humanos (cajas-E separadas) y murino de *cadherina-E* (2 cajas-E adyacentes en el elemento E-pal) contribuye de forma significativa a su reconocimiento y acción represora de Snail1 (Figura 37). La influencia de la organización de cajas-E en la estructura de los promotores sobre la capacidad represora de Snail1 y Snail2 se puso de nuevo de manifiesto cuando analizamos el efecto de diferentes mutantes de las cajas-E en la actividad represora de ambos factores. Los resultados obtenidos indican que el promotor murino requiere la integridad de las dos cajas-E del elemento E-pal de *cadherina-E* para la acción represora de ambos factores, mientras que en el caso del promotor de *cadherina-E* humano se requiere la integridad de dos cajas-E cualesquiera para la represión por Snail1 y Snail2 con mayor eficiencia (Figura 37).

En conjunto, los datos obtenidos en el análisis de los mutantes individuales o combinados de Snail1 y Snail2 en diferentes promotores muestran por primera vez diferencias funcionales con significado biológico en la región de los ZFs de estos factores, con un papel predominante de ZF1 y ZF2 para la actividad transcripcional de Snail1 y una función clave de ZF3 y ZF4 de Snail2 para su actividad y unión a los promotores endógenos. Una razón, que explicaría estas diferencias funcionales, podría ser que los cambios no conservativos observados en residuos adyacentes a las cisteínas de los dedos ZF1 y ZF2 de Snail1 y los equivalentes ZF2 y ZF3 de Snail2 (N160 a D166, y T183 a K189, respectivamente) (Figura 43) confieran una organización espacial distinta a la α -hélice, afectando así a la organización tridimensional global de los ZFs y a su capacidad de unión al DNA. La diferente geometría de interacción factor-DNA que presentan ambos factores podría

explicar los efectos diferenciales de las mutaciones individuales de los ZFs sobre la represión de promotores y capacidad de unión al DNA.

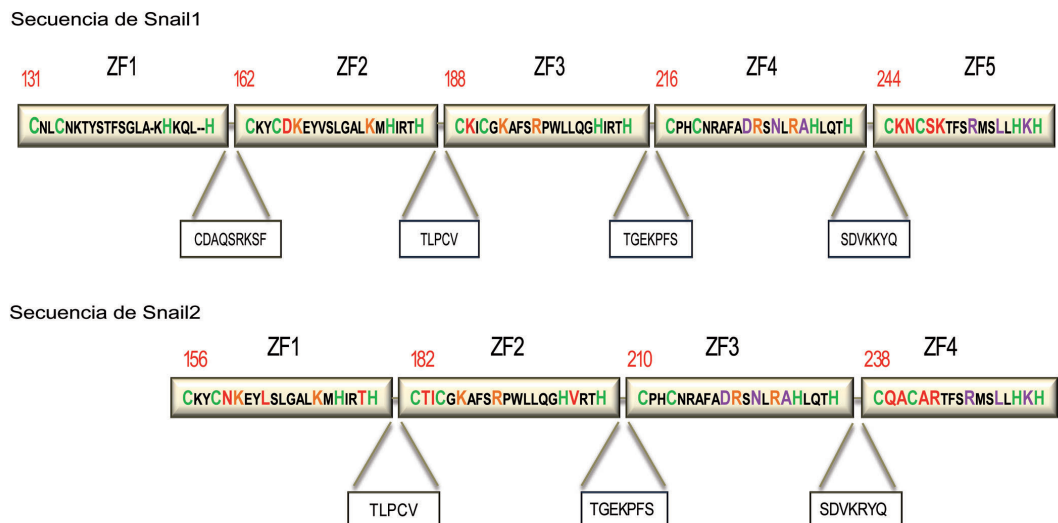


Figura 43. Esquema representativo de la secuencia de los ZFs de Snail1 y Snail2. Comparación de la secuencia de aminoácidos de los ZFs de Snail1 y Snail2 de ratón. El código de colores indica los residuos C₂H₂, de unión a importinas (K/R), residuos de la α-hélice importantes para el reconocimiento de las bases, y cambios de aminoácidos no conservativos. También se muestra la secuencia de los conectores entre los ZFs.

Residuos C₂H₂
Residuos de K/R de unión a importinas
Residuos de las α-hélices involucrados en la unión a cajas-E
Cambios de aminoácidos no conservativos

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la diferente organización estructural y propiedades funcionales de los ZFs considerados hasta la fecha equivalentes de Snail1 (ZF1, ZF2) y Snail2 (ZF2, ZF3) (Manzanares et al., 2001), influyen diferencialmente en la unión al DNA, y posiblemente en el reclutamiento de co-represores. Además, el análisis estructural realizado apoya la equivalente organización espacial tridimensional del ZF3 de Snail1 y ZF4 de Snail2, de acuerdo con su secuencia de aminoácidos estrictamente conservada (solo hay un cambio conservativo) (Figura 43) (Sefton et al., 1998; Manzanares et al., 2001; Villarejo et al., 2014), y con el efecto deletéreo de su mutación individual en la represión de los promotores humanos. Sorprendentemente, el último ZF de Snail1 (ZF4) y Snail2 (ZF5) no contribuye de forma significativa a la actividad represora o de unión al DNA de ambos factores, indicando una función, al menos parcialmente, dispensable de estos ZFs, en contraposición a su conservación de secuencia (Sefton et al., 1998; Manzanares et al., 2001) (Figura 43).

La Figura 44 muestra un resumen de los resultados obtenidos, que en su conjunto indican que los ZFs de Snail1 y Snail2 no son equivalentes, requiriéndose combinaciones específicas de ZFs para ejercer la actividad represora dependiendo del contexto específico y organización de cajas-E en el promotor humano o de ratón de *cadherina-E*. También sugieren que las diferencias

estructurales podrían ser las responsables de la regulación diferencial de conjuntos específicos de genes y del diferente comportamiento biológico de los factores Snail1 y Snail2 (Manzanares et al., 2001; Moreno-Bueno et al., 2006; Olmeda et al., 2008).

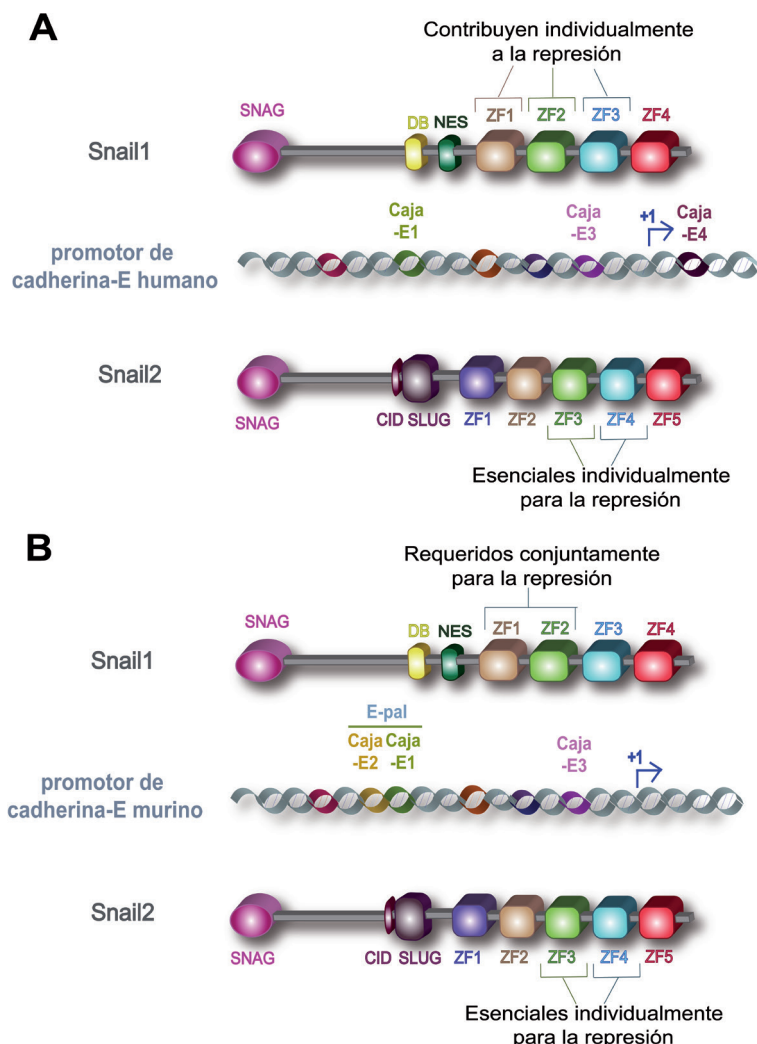


Figura 44. Modelo de la participación de los ZFs de Snail1 y Snail2 en la represión del promotor de *cadherina-E*. Representación esquemática que muestra la participación de los ZFs de Snail1 y Snail2 en la represión de *cadherina-E* humano y de ratón. **(A)** Con el promotor humano el ZF3 y ZF4 de Snail2, y el ZF1, ZF2, y ZF3 de Snail1 se requieren de forma individual para la represión eficiente del promotor. **(B)** En el caso del promotor de ratón, el ZF3 y ZF4 de Snail2 son esenciales de forma individual para la represión, mientras que la combinación del ZF1 y ZF2 se requiere para una represión eficiente. El último ZF de Snail2 (ZF5) y de Snail1 (ZF4) es dispensable o tiene una contribución menor a la actividad represora de ambos factores.

2.2. Relevancia de los dedos de zinc de Snail1 y Snail2 *in vivo*: capacidad de inducir TEM.

La relevancia biológica de los dedos ZF1 y ZF2 de Snail1 y de ZF3 o ZF4 de Snail2 se puso de manifiesto analizando la capacidad de inducir TEM de los correspondientes mutantes en células MDCK-II (Figura 38 y 39), en las que el promotor de *cadherina-E* presenta una distribución de cajas-E similar al promotor humano (Peinado et al., 2004a) (Figura 3). Los resultados mostraron que las versiones mutantes de ambos factores carecían de la capacidad de inducir TEM, y en el caso particular de Snail2, la pérdida de actividad biológica podría ser atribuida a la pérdida de capacidad represora y a la disminución de la vida media de los mutantes ZF3 y ZF4. De acuerdo

con la pérdida de la capacidad de inducir TEM, la alteración de la estructura de los ZFs clave también altera la expresión de marcadores mesenquimales, sugiriendo un efecto directo o indirecto en genes adicionales además de la *cadherina-E* y la *claudina-1*. Estas mutaciones en ZFs específicos podrían también explicar observaciones previas en las que la sobre-expresión de Snail1 y Snail2 en diferentes tumores y líneas celulares no se correlaciona con una TEM completa o con un comportamiento patológico (Cano et al., 2000; Dominguez et al., 2003; Elloul et al., 2005; Come et al., 2006; Castro Alves et al., 2007; Viñas-Castells et al., 2010). Además, el diferente comportamiento de ZFs específicos de Snail1 y Snail2 podría explicar las diferencias a nivel de capacidad metastásica y tumorigénica detectadas cuando se silencia Snail1 o Snail2 en células de carcinoma de piel (Olmeda et al., 2007; Olmeda et al., 2008). En conjunto, estos datos proporcionan nueva información para el diseño de intervenciones terapéuticas dirigidas frente a ZFs específicos de Snail1 y Snail2, para lo que sería necesario realizar ensayos preclínicos que establecieran la importancia de los ZFs identificados como esenciales en este trabajo.

2.3. Contribución de los dominios SNAG y SLUG de Snail2 a su capacidad de inducir TEM.

Los resultados obtenidos en el análisis de los dominios SNAG y SLUG demuestran que el dominio SNAG de Snail2 es esencial para la inducción de TEM (Figura 40), al igual que se había descrito previamente para Snail1 (Batlle et al., 2000; Peinado et al., 2004b). Además, observamos que el dominio SNAG es importante para la estabilidad de Snail2, tal como se había descrito para Snail1 (Lin et al., 2010). Sin embargo, se desconoce si el dominio SNAG controla la estabilidad de Snail2 influyendo en su interacción con Ppa, u otros componentes de la maquinaria del proteasoma. No obstante, cabe destacar que la región de Snail2 de *Xenopus* que interacciona con Ppa, así como la interacción de Snail1 humano con FBXL14, se localizan fuera del dominio SNAG (Vernon and LaBonne, 2006; Viñas-Castells et al., 2010).

Por otro lado, nuestro análisis del dominio SLUG de Snail2 indica que esta región podría ejercer una modulación negativa en la función de este factor, ya que las células que expresan establemente el mutante Snail2- Δ SLUG presentan un fenotipo de TEM más pronunciado que las células que expresan la forma silvestre de Snail2 (Figura 40). Una posible hipótesis es que el dominio SLUG confiera una conformación a Snail2 que puede evitar la adecuada interacción del dominio SNAG con los co-represores para promover una represión activa y una inducción de TEM. Una explicación alternativa podría ser que la unión de CtBP a Snail2, que tiene lugar a través del dominio SLUG (Molina-Ortiz et al., 2012), bloquee la unión eficiente de co-represores al dominio SNAG.

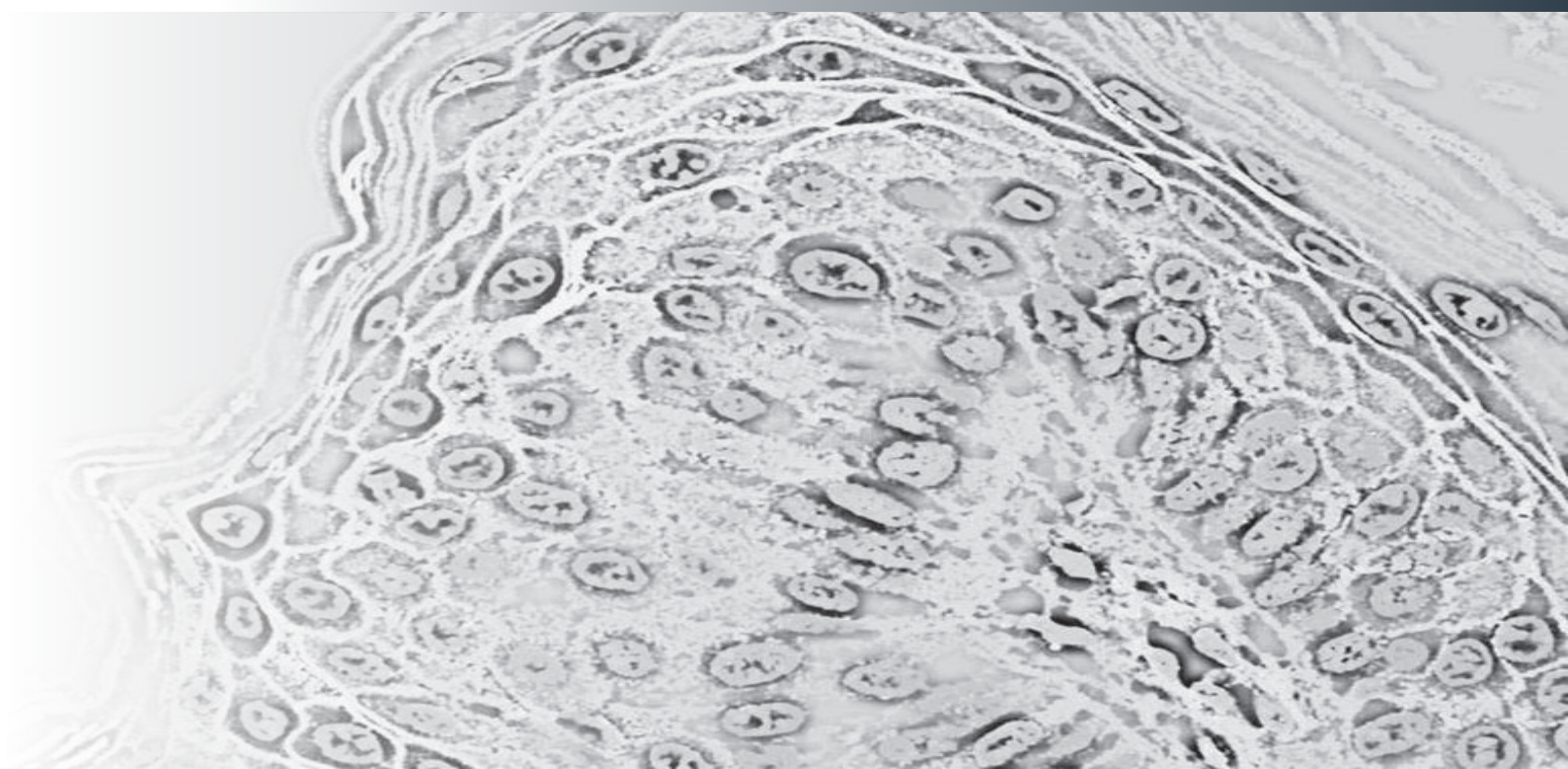
2.4. Relevancia de la fosforilación de la serina 4 de Snail2 en su capacidad de inducir TEM.

Una amplia variedad de estudios han descrito diferentes eventos de fosforilación de Snail1. Por ejemplo, la fosforilación por GSK3 β o PKD1 ejerce una acción negativa (Zhou et al., 2004; Yook et al., 2005; Du et al., 2010a), mientras que la fosforilación por PAK1, CK2, PKC o Lats2, tiene un efecto positivo sobre la funcionalidad de Snail1 (Yang et al., 2005; MacPherson et al., 2010; Zhang et al., 2012). Sin embargo, la regulación post-traducciona de Snail2 se desconocía al inicio de esta tesis, excepto por su interacción y modulación por Mdm2 (Wang et al., 2009), la proteína F-box Ppa (Vernon & LaBonne, 2006), y la más recientemente descrita fosforilación por GSK3 β (Kim et al., 2012). Estudios recientes de nuestro laboratorio han mostrado que Snail2 se fosforila *in vivo* en la serinas 4 y 88 (Molina-Ortiz et al., 2012). En este estudio hemos procedido a analizar el papel de la fosforilación de la serina 4 sobre la actividad funcional de Snail2. Los resultados mostraron que la expresión estable del mutante fosfomimético Snail2-S4D presenta una mayor capacidad represora y origina un fenotipo marcado de TEM, mientras que la expresión estable de la forma no fosforilable Snail2-S4A, pierde capacidad represora e induce una TEM parcial, lo que sugiere que la integridad de la serina 4 y su fosforilación se requieren para la actividad funcional de Snail2 (Figura 41). Resultados recientes obtenidos con Snail1 muestran que el factor fosforilado en la serina 4 potencia su localización nuclear y capacidad represora, mientras que la forma no fosforilada es exportada del núcleo por lo que se reduce su capacidad represora (Mingot et al., 2013). A la luz de estos datos, podemos argumentar que en el caso de Snail2 podría ocurrir una situación similar; de hecho, resultados previos del laboratorio muestran un aumento de la localización nuclear de Snail2-S4D y un aumento de la localización citoplasmática del mutante Snail2-S4A (Molina-Ortiz, P., 2010), apoyando así la similitud funcional de la fosforilación de la serina 4 de ambos factores Snail.

En conjunto, todos los datos presentados aportan información sobre la importancia de la estructura de los diferentes dominios de Snail1 y Snail2, y que proporcionan la base para poder explicar las diferencias existentes en la acción que realizan ambos factores tanto en desarrollo embrionario como en situaciones patológicas.

CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

117



1. Caracterización del papel de Snail2 en la homeostasis de la piel de ratón: regulación del folículo piloso y respuesta a carcinogénesis química.

1. Snail2 es necesario para la homeostasis del folículo piloso en el periodo de telogén refractaria. La ausencia de Snail2 promueve la entrada prematura en anagén.
2. La dosis génica de *Snail2* modula la respuesta a la carcinogénesis química de piel. La presencia de un único alelo de *Snail2* promueve una respuesta antitumoral, mientras que la deficiencia completa de *Snail2* induce una respuesta pro-tumoral.
3. La deficiencia total o parcial de *Snail2* en la medula ósea reproduce la respuesta a la carcinogénesis química observada en los ratones *Snail2*^{-/-} o *Snail2*^{+/-}, respectivamente.
4. La ausencia de *Snail2* en los precursores hematopoyéticos promueve la movilización y acumulación de precursores mieloides y genera una respuesta inflamatoria aguda en las lesiones pre-malignas.

2. Caracterización funcional de los dominios funcionales de Snail1 y Snail2.

1. Los dedos de zinc de Snail1 y Snail2 no son funcionalmente equivalentes. La actividad funcional de Snail1 requiere la integridad de los dedos ZF1 y ZF2 de forma conjunta, mientras que la actividad de Snail2 requiere la integridad del dedo ZF3 o ZF4 de forma individual.
2. La distribución de cajas-E de los promotores diana contribuye a la eficiente represión de Snail1 y Snail2.
3. El dominio SNAG de Snail2 y la integridad de la serina 4 son esenciales para la inducción de TEM, mientras que el dominio SLUG de Snail2 modula negativamente dicha capacidad.

1. Characterization of Snail2 role in skin homeostasis: hair follicle cycle modulation and response to chemical induced carcinogenesis.

1. Snail2 is required for the hair follicle homeostasis at the refractory telogen. The absence of *Snail2* leads to an early entry into anagen.
2. *Snail2* gene dose modulates the response to skin carcinogenesis. The presence of one *Snail2* allele triggers an anti-tumoral response, whereas the complete absence of Snail2 leads to a protumorigenic response.
3. The complete or partial absence of *Snail2* in the bone marrow mimic the response to chemical carcinogenesis observed in *Snail2*^{-/-} and *Snail2*^{+/-} mice, respectively.
4. *Snail2* absence in hematopoietic progenitors promotes the mobilization and accumulation of myeloid precursors, that leads to an acute inflammatory response in pre-malignant lesions.

2. Functional characterization of Snail1 and Snail2 DBD domain, and SNAG and SLUG domain of Snail2.

1. Snail1 and Snail2 zinc fingers are not functionally equivalent. The Snail1 functional activity requires the integrity of both ZF1 and ZF2, whereas Snail2 requires individual ZF3 or ZF4 for its function.
2. E-box distribution in target promoters contributes to an efficient repression by Snail1 and Snail2.
3. Snail2 SNAG domain and serine 4 phosphorylation are required for EMT induction, whereas Snail2 SLUG domain impairs such ability.



ALLAVENA, P., SICA, A., SOLINAS, G., PORTA, C. & MANTOVANI, A. 2008. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol*, 66, 1-9.

APARICIO, O., GEISBERG, J. V. & STRUHL, K. 2004. Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 17, Unit 17 7.

ARNOUX, V., NASSOUR, M., L'HELGOUALC'H, A., HIPSKIND, R. A. & SAVAGNER, P. 2008. Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing. *Mol Biol Cell*, 19, 4738-49.

BALMAIN, A., RAMSDEN, M., BOWDEN, G. T. & SMITH, J. 1984. Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature*, 307, 658-60.

BARRALLO-GIMENO, A. & NIETO, M. A. 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, 132, 3151-61.

BARRALLO-GIMENO, A. & NIETO, M. A. 2009. Evolutionary history of the Snail/Scratch superfamily. *Trends Genet*, 25, 248-52.

BATLLE, E., SANCHO, E., FRANCI, C., DOMINGUEZ, D., MONFAR, M., BAULIDA, J. & GARCIA DE HERREROS, A. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*, 2, 84-9.

BEHRENS, J., LOWRICK, O., KLEIN-HITPASS, L. & BIRCHMEIER, W. 1991. The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 11495-9.

BERX, G., CLETON-JANSEN, A. M., NOLLET, F., DE LEEUW, W. J., VAN DE VIJVER, M., CORNELISSE, C. & VAN ROY, F. 1995. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J*, 14, 6107-15.

BLANPAIN, C. & FUCHS, E. 2006. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 339-73.

BLANPAIN, C., LOWRY, W. E., GEOGHEGAN, A., POLAK, L. & FUCHS, E. 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*, 118, 635-48.

BOLOS, V., PEINADO, H., PEREZ-MORENO, M. A., FRAGA, M. F., ESTELLER, M. & CANO, A. 2003. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci*, 116, 499-511.

BOUTWELL, R. K. 1974. The function and mechanism of promoters of carcinogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol*, 2, 419-43.

BRADLEY, C. K., NORTON, C. R., CHEN, Y., HAN, X., BOOTH, C. J., YOON, J. K., KREBS, L. T. & GRIDLEY, T. 2013. The snail family gene *snai3* is not essential for embryogenesis in mice. *PLoS One*, 8, e65344.

BROWN, K., QUINTANILLA, M., RAMSDEN, M., KERR, I. B., YOUNG, S. & BALMAIN, A. 1986. v-ras genes from Harvey and BALB murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell*, 46, 447-56.

BROWN, R. S., SANDER, C. & ARGOS, P. 1985. The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Lett*, 186, 271-4.

BUKHOLM, I. K., NESLAND, J. M. & BORRESEN-DALE, A. L. 2000. Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients [seecomments]. *J Pathol*, 190, 15-9.

CANO, A., GAMALLO, C., KEMP, C. J., BENITO, N., PALACIOS, J., QUINTANILLA, M. & BALMAIN, A. 1996. Expression pattern of the cell adhesion molecules. E-cadherin, P-cadherin and alpha 6 beta 4 integrin is altered in pre-malignant skin tumors of p53-deficient mice. *Int J Cancer*, 65, 254-62.

CANO, A., PEREZ-MORENO, M. A., RODRIGO, I., LOCASCIO, A., BLANCO, M. J., DEL BARRIO, M. G., PORTILLO, F. & NIETO, M. A. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, 2, 76-83.

CAMEL, J., PAPADOGEORGAKIS, E., HILL, L., BROWNE, G. J., RICHARD, G., WIERINCKX, A., SALDANHA, G., OSBORNE, J., HUTCHINSON, P., TSE, G., LACHUER, J., PUISIEUX, A., PRINGLE, J. H., ANSIEAU, S. & TULCHINSKY, E. 2013. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell*, 24, 466-80.

CARVER, E. A., JIANG, R., LAN, Y., ORAM, K. F. & GRIDLEY, T. 2001. The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol*, 21, 8184-8.

CASAS, E., KIM, J., BENDESKY, A., OHNO-MACHADO, L., WOLFE, C. J. & YANG, J. 2011. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer*

Res, 71, 245-54.

CASTRO ALVES, C., ROSIVATZ, E., SCHOTT, C., HOLLWECK, R., BECKER, I., SARBIA, M., CARNEIRO, F. & BECKER, K. F. 2007. Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin. *J Pathol*, 211, 507-15.

CAULIN, C., BAULUZ, C., GANDARILLAS, A., CANO, A. & QUINTANILLA, M. 1993. Changes in keratin expression during malignant progression of transformed mouse epidermal keratinocytes. *Exp Cell Res*, 204, 11-21.

CAULIN, C., LOPEZ-BARCONS, L., GONZALES-GARRIGUES, M., NAVARRO, P., LOZANO, E., RODRIGO, I., GAMALLO, C., CANO, A., FABRA, A. & QUINTANILLA, M. 1996. Suppression of the metastatic phenotype of a mouse skin carcinoma cell line independent of E-cadherin expression and correlated with reduced Ha-ras oncogene products. *Mol Carcinog*, 15, 104-14.

CHEN, C., WEI, Y., HUMMEL, M., HOFFMANN, T. K., GROSS, M., KAUFMANN, A. M. & ALBERS, A. E. 2011. Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 6, e16466.

CHEN, H., TAKAHARA, M., XIE, L., TAKEUCHI, S., TU, Y., NAKAHARA, T., UCHI, H., MOROI, Y. & FURUE, M. 2013. Levels of the EMT-related protein Snail/Slug are not correlated with p53/p63 in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol*, 40, 651-6.

CHEN, N., NOMURA, M., SHE, Q. B., MA, W. Y., BODE, A. M., WANG, L., FLAVELL, R. A. & DONG, Z. 2001. Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2)-terminal kinase-2-deficient mice. *Cancer Res*, 61, 3908-12.

CHENG, C. W., WU, P. E., YU, J. C., HUANG, C. S., YUE, C. T., WU, C. W. & SHEN, C. Y. 2001. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene*, 20, 3814-23.

CHENG, P., CORZO, C. A., LUETTEKE, N., YU, B., NAGARAJ, S., BUI, M. M., ORTIZ, M., NACKEN, W., SORG, C., VOGL, T., ROTH, J. & GABRILOVICH, D. I. 2008. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med*, 205, 2235-49.

CHENG, P., KUMAR, V., LIU, H., YOUN, J. I., FISHMAN, M., SHERMAN, S. & GABRILOVICH, D. 2014. Effects of notch signaling on regulation of myeloid cell differentiation in cancer. *Cancer Res*, 74, 141-52.

CHOI, Y. S., ZHANG, Y., XU, M., YANG, Y., ITO, M., PENG, T., CUI, Z., NAGY, A., HADJANTONAKIS, A. K., LANG, R. A., COTSARELIS, G., ANDL, T., MORRISEY, E. E. & MILLAR, S. E. 2013. Distinct functions for Wnt/beta-catenin in hair follicle stem cell proliferation and survival and interfollicular epidermal homeostasis. *Cell Stem Cell*, 13, 720-33.

CHRISTOFORI, G. & SEMB, H. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*, 24, 73-6.

CHRISTY, B. A., LAU, L. F. & NATHANS, D. 1988. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 7857-61.

COBALEDA, C., PEREZ-CARO, M., VICENTE-DUENAS, C. & SANCHEZ-GARCIA, I. 2007. Function of the zinc-finger transcription factor SNAI2 in cancer and development. *Annu Rev Genet*, 41, 41-61.

COHEN, M. E., YIN, M., PAZNEKAS, W. A., SCHERTZER, M., WOOD, S. & JABS, E. W. 1998. Human SLUG gene organization, expression, and chromosome map location on 8q. *Genomics*, 51, 468-71.

COME, C., MAGNINO, F., BIBEAU, F., DE SANTA BARBARA, P., BECKER, K. F., THEILLET, C. & SAVAGNER, P. 2006. Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res*, 12, 5395-402.

COMIJN, J., BERTX, G., VERMASSEN, P., VERSCHUEREN, K., VAN GRUNSVEN, L., BRUYNEEL, E., MAREEL, M., HUYLEBROECK, D. & VAN ROY, F. 2001. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell*, 7, 1267-78.

CONACCI-SORRELL, M., ZHURINSKY, J. & BEN-ZE'EV, A. 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest*, 109, 987-91.

CONDEELIS, J. & SEGALL, J. E. 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer*, 3, 921-30.

COUSSENS, L. M. & WERB, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-7.

CUBILLO, E., DIAZ-LOPEZ, A., CUEVAS, E. P., MORENO-BUENO, G., PEINADO, H., MONTES, A., SANTOS, V., PORTILLO, F. & CANO, A. 2013. E47 and Id1 interplay in epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 8, e59948.

DA SILVA-DIZ, V., SOLE-SANCHEZ, S., VALDES-GUTIERREZ, A., URPI, M., RIBA-ARTES, D., PENIN, R. M., PASCUAL, G., GONZALEZ-SUAREZ, E., CASANOVAS, O., VINALS, F., PARAMIO, J. M., BATLLE, E.

- & MUNOZ, P. 2013. Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis. *Oncogene*, 32, 3732-43.
- DASGUPTA, R. & FUCHS, E. 1999. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development*, 126, 4557-68.
- DE CRAENE, B. & BERX, G. 2013. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, 13, 97-110.
- DE CRAENE, B., DENECKER, G., VERMASSEN, P., TAMINAU, J., MAUCH, C., DERORE, A., JONKERS, J., FUCHS, E. & BERX, G. 2014. Epidermal Snail expression drives skin cancer initiation and progression through enhanced cytoprotection, epidermal stem/progenitor cell expansion and enhanced metastatic potential. *Cell Death Differ*, 21, 310-20.
- DESCHENE, E. R., MYUNG, P., ROMPOLAS, P., ZITO, G., SUN, T. Y., TAKETO, M. M., SAOTOME, I. & GRECO, V. 2014. beta-Catenin activation regulates tissue growth non-cell autonomously in the hair stem cell niche. *Science*, 343, 1353-6.
- DI PIAZZA, M., NOWELL, C. S., KOCH, U., DURHAM, A. D. & RADTKE, F. 2012. Loss of cutaneous TSLP-dependent immune responses skews the balance of inflammation from tumor protective to tumor promoting. *Cancer Cell*, 22, 479-93.
- DIAZ-LOPEZ, A., MORENO-BUENO, G. & CANO, A. 2014. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag Res*, 6, 205-16.
- DIGIOVANNI, J. 1992. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther*, 54, 63-128.
- DOMINGUEZ, D., MONTSERRAT-SENTIS, B., VIRGOS-SOLER, A., GUAITA, S., GRUESO, J., PORTA, M., PUIG, I., BAULIDA, J., FRANCI, C. & GARCIA DE HERREROS, A. 2003. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*, 23, 5078-89.
- DONATI, G., PROSERPIO, V., LICHTENBERGER, B. M., NATSUGA, K., SINCLAIR, R., FUJIWARA, H. & WATT, F. M. 2014. Epidermal Wnt/beta-catenin signaling regulates adipocyte differentiation via secretion of adipogenic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E1501-9.
- DOTTO, G. P. 2008. Notch tumor suppressor function. *Oncogene*, 27, 5115-23.
- DOUVILLE, J., BEAULIEU, R. & BALICKI, D. 2009. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 18, 17-25.
- DU, C., ZHANG, C., HASSAN, S., BISWAS, M. H. & BALAJI, K. C. 2010a. Protein kinase D1 suppresses

epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail. *Cancer Res*, 70, 7810-9.

DU, F., NAKAMURA, Y., TAN, T. L., LEE, P., LEE, R., YU, B. & JAMORA, C. 2010b. Expression of snail in epidermal keratinocytes promotes cutaneous inflammation and hyperplasia conducive to tumor formation. *Cancer Res*, 70, 10080-9.

EGER, A., AIGNER, K., SONDEREGGER, S., DAMPIER, B., OEHLER, S., SCHREIBER, M., BERX, G., CANO, A., BEUG, H. & FOISNER, R. 2005. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, 24, 2375-85.

EISTETTER, H. R., ADOLPH, S., RINGWALD, M., SIMON-CHAZOTTES, D., SCHUH, R., GUENET, J. L. & KEMLER, R. 1988. Chromosomal mapping of the structural gene coding for the mouse cell adhesion molecule uvomorulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 3489-93.

ELINAV, E., NOWARSKI, R., THAISS, C. A., HU, B., JIN, C. & FLAVELL, R. A. 2013. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*, 13, 759-71.

ELLOUL, S., ELSTRAND, M. B., NESLAND, J. M., TROPE, C. G., KVALHEIM, G., GOLDBERG, I., REICH, R. & DAVIDSON, B. 2005. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer*, 103, 1631-43.

ENSHELL-SEIJFFERS, D., LINDON, C., KASHIWAGI, M. & MORGAN, B. A. 2010. beta-catenin activity in the dermal papilla regulates morphogenesis and regeneration of hair. *Dev Cell*, 18, 633-42.

ESTRACH, S., CORDES, R., HOZUMI, K., GOSSLER, A. & WATT, F. M. 2008. Role of the Notch ligand Delta1 in embryonic and adult mouse epidermis. *J Invest Dermatol*, 128, 825-32.

EVDOKIMOVA, V., TOGNON, C., NG, T., RUZANOV, P., MELNYK, N., FINK, D., SOROKIN, A., OVCHINNIKOV, L. P., DAVICIONI, E., TRICHE, T. J. & SORENSEN, P. H. 2009. Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell*, 15, 402-15.

EVERTS, H. B., SUNDBERG, J. P., KING, L. E., JR. & ONG, D. E. 2007. Immunolocalization of enzymes, binding proteins, and receptors sufficient for retinoic acid synthesis and signaling during the hair cycle. *J Invest Dermatol*, 127, 1593-604.

EWING, M. W., CONTI, C. J., KRUSZEWSKI, F. H., SLAGA, T. J. & DIGIOVANNI, J. 1988. Tumor progression in Sencar mouse skin as a function of initiator dose and promoter dose, duration, and

type. *Cancer Res*, 48, 7048-54.

FARALDO, M. L., RODRIGO, I., BEHRENS, J., BIRCHMEIER, W. & CANO, A. 1997. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*, 20, 33-47.

FRIDLENDER, Z. G., SUN, J., KIM, S., KAPOOR, V., CHENG, G., LING, L., WORTHEN, G. S. & ALBELDA, S. M. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 16, 183-94.

FUCHS, E. & GREEN, H. 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19, 1033-42.

FUCHS, E. 1990. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol*, 111, 2807-14.

FUCHS, E. 2007. Scratching the surface of skin development. *Nature*, 445, 834-42.

FUCHS, E. & HORSLEY, V. 2008. More than one way to skin. *Genes Dev*, 22, 976-85.

FUSE, N., HIROSE, S. & HAYASHI, S. 1994. Diploidy of Drosophila imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by escargot. *Genes Dev*, 8, 2270-81.

GABRILOVICH, D. I., CIERNIK, I. F. & CARBONE, D. P. 1996. Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cell Immunol*, 170, 101-10.

GABRILOVICH, D. I. & NAGARAJ, S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9, 162-74.

GAO, D. & MITTAL, V. 2009. The role of bone-marrow-derived cells in tumor growth, metastasis initiation and progression. *Trends Mol Med*, 15, 333-43.

GHAZIZADEH, S. & TAICHMAN, L. B. 2001. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J*, 20, 1215-22.

GIMENEZ-CONTI, I., ALDAZ, C. M., BIANCHI, A. B., ROOP, D. R., SLAGA, T. J. & CONTI, C. J. 1990. Early expression of type I K13 keratin in the progression of mouse skin papillomas. *Carcinogenesis*, 11, 1995-9.

GIRARDI, M., OPPENHEIM, D. E., STEELE, C. R., LEWIS, J. M., GLUSAC, E., FILLER, R., HOBBY, P., SUTTON, B., TIGELAAR, R. E. & HAYDAY, A. C. 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gamma-madelta T cells. *Science*, 294, 605-9.

GIROLDI, L. A., BRINGUIER, P. P., DE WEIJERT, M., JANSEN, C., VAN BOKHOVEN, A. & SCHALKEN, J. A. 1997. Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 241, 453-8.

GRADY, W. M., WILLIS, J., GUILFORD, P. J., DUNBIER, A. K., TORO, T. T., LYNCH, H., WIESNER, G., FERGUSON, K., ENG, C., PARK, J. G., KIM, S. J. & MARKOWITZ, S. 2000. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet*, 26, 16-7.

GRAFF, J. R., GABRIELSON, E., FUJII, H., BAYLIN, S. B. & HERMAN, J. G. 2000. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem*, 275, 2727-32.

GRECO, V., CHEN, T., RENDL, M., SCHOBER, M., PASOLLI, H. A., STOKES, N., DELA CRUZ-RACELIS, J. & FUCHS, E. 2009. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell*, 4, 155-69.

GRIMES, H. L., CHAN, T. O., ZWEIDLER-MCKAY, P. A., TONG, B. & TSICHLIS, P. N. 1996. The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol*, 16, 6263-72.

GROOTECLAES, M. L. & FRISCH, S. M. 2000. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene*, 19, 3823-8.

GUILFORD, P., HOPKINS, J., HARRAWAY, J., MCLEOD, M., MCLEOD, N., HARAWIRA, P., TAITE, H., SCOULAR, R., MILLER, A. & REEVE, A. E. 1998. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 392, 402-5.

GUMBINER, B. M. & YAMADA, K. M. 1995. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*, 7, 615-8.

GUO, W., KECKESOVA, Z., DONAHER, J. L., SHIBUE, T., TISCHLER, V., REINHARDT, F., ITZKOVITZ, S., NOSKE, A., ZURRER-HARDI, U., BELL, G., TAM, W. L., MANI, S. A., VAN OUDENAARDEN, A. & WEINBERG, R. A. 2012. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell*, 148, 1015-28.

GUPTA, P. B., KUPERWASSER, C., BRUNET, J. P., RAMASWAMY, S., KUO, W. L., GRAY, J. W., NABER, S. P. & WEINBERG, R. A. 2005. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet*, 37, 1047-54.

- HAJRA, K. M., CHEN, D. Y. & FEARON, E. R. 2002. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res*, 62, 1613-8.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HARTWELL, K. A., MUIR, B., REINHARDT, F., CARPENTER, A. E., SGROI, D. C. & WEINBERG, R. A. 2006. The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18969-74.
- HEMAVATHY, K., ASHRAF, S. I. & IP, Y. T. 2000a. Snail/slugs family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*, 257, 1-12.
- HEMAVATHY, K., GURU, S. C., HARRIS, J., CHEN, J. D. & IP, Y. T. 2000b. Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. *Mol Cell Biol*, 20, 5087-95.
- HEMAVATHY, K., HU, X., ASHRAF, S. I., SMALL, S. J. & IP, Y. T. 2004. The repressor function of snail is required for Drosophila gastrulation and is not replaceable by Escargot or Worniu. *Dev Biol*, 269, 411-20.
- HENNIG, G., LOWRICK, O., BIRCHMEIER, W. & BEHRENS, J. 1996. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J Biol Chem*, 271, 595-602.
- HENNINGS, H. & YUSPA, S. H. 1985. Two-stage tumor promotion in mouse skin: an alternative interpretation. *J Natl Cancer Inst*, 74, 735-40.
- HERRANZ, N., PASINI, D., DIAZ, V. M., FRANCI, C., GUTIERREZ, A., DAVE, N., ESCRIVA, M., HERNANDEZ-MUNOZ, I., DI CROCE, L., HELIN, K., GARCIA DE HERREROS, A. & PEIRO, S. 2008. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol Cell Biol*, 28, 4772-81.
- HOHL, D., RUF OLANO, B., DE VIRAGH, P. A., HUBER, M., DETRISAC, C. J., SCHNYDER, U. W. & ROOP, D. R. 1993. Expression patterns of loricrin in various species and tissues. *Differentiation*, 54, 25-34.
- HOU, Z., PENG, H., AYYANATHAN, K., YAN, K. P., LANGER, E. M., LONGMORE, G. D. & RAUSCHER, F. J., 3RD 2008. The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, 28, 3198-207.

HSU, Y. C., PASOLLI, H. A. & FUCHS, E. 2011. Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. *Cell*, 144, 92-105.

HUDSON, L. G., NEWKIRK, K. M., CHANDLER, H. L., CHOI, C., FOSSEY, S. L., PARENT, A. E. & KUSEWITT, D. F. 2009. Cutaneous wound reepithelialization is compromised in mice lacking functional Slug (Snai2). *J Dermatol Sci*, 56, 19-26.

INOUE, A., SEIDEL, M. G., WU, W., KAMIZONO, S., FERRANDO, A. A., BRONSON, R. T., IWASAKI, H., AKASHI, K., MORIMOTO, A., HITZLER, J. K., PESTINA, T. I., JACKSON, C. W., TANAKA, R., CHONG, M. J., MCKINNON, P. J., INUKAI, T., GROSVELD, G. C. & LOOK, A. T. 2002. Slug, a highly conserved zinc finger transcriptional repressor, protects hematopoietic progenitor cells from radiation-induced apoptosis in vivo. *Cancer Cell*, 2, 279-88.

INUKAI, T., INOUE, A., KUROSAWA, H., GOI, K., SHINJO, T., OZAWA, K., MAO, M., INABA, T. & LOOK, A. T. 1999. SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell*, 4, 343-52.

ITO, M., LIU, Y., YANG, Z., NGUYEN, J., LIANG, F., MORRIS, R. J. & COTSARELIS, G. 2005. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med*, 11, 1351-4.

JAMORA, C., LEE, P., KOCENIEWSKI, P., AZHAR, M., HOSOKAWA, R., CHAI, Y. & FUCHS, E. 2005. A signaling pathway involving TGF-beta2 and snail in hair follicle morphogenesis. *PLoS Biol*, 3, e11.

JIANG, R., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A. & GRIDLEY, T. 1997. Genomic organization and chromosomal localization of the mouse snail (Sna) gene. *Mamm Genome*, 8, 686-8.

JIANG, R., NORTON, C. R., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A. & GRIDLEY, T. 1998a. Genomic organization, expression and chromosomal localization of the mouse Slug (Slugh) gene. *Biochim Biophys Acta*, 1443, 251-4.

JIANG, R., LAN, Y., NORTON, C. R., SUNDBERG, J. P. & GRIDLEY, T. 1998b. The Slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Dev Biol*, 198, 277-85.

JONES, P. H. & WATT, F. M. 1993. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 73, 713-24.

- JOYCE, J. A. & POLLARD, J. W. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9, 239-52.
- KAJITA, M., MCCLINIC, K. N. & WADE, P. A. 2004. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol*, 24, 7559-66.
- KIM, J. Y., KIM, Y. M., YANG, C. H., CHO, S. K., LEE, J. W. & CHO, M. 2012. Functional regulation of Slug/Snail2 is dependent on GSK-3beta-mediated phosphorylation. *FEBS J*, 279, 2929-39.
- KIMURA-UEKI, M., ODA, Y., OKI, J., KOMI-KURAMOCHI, A., HONDA, E., ASADA, M., SUZUKI, M. & IMAMURA, T. 2012. Hair cycle resting phase is regulated by cyclic epithelial FGF18 signaling. *J Invest Dermatol*, 132, 1338-45.
- KOSTER, M. I. & ROOP, D. R. 2007. Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 93-113.
- KURREY, N. K., JALGAONKAR, S. P., JOGLEKAR, A. V., GHANATE, A. D., CHASKAR, P. D., DOIPHODE, R. Y. & BAPAT, S. A. 2009. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells*, 27, 2059-68.
- LAMOUILLE, S., SUBRAMANYAM, D., BLELLOCH, R. & DERYNCK, R. 2013. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 200-7.
- LANDER, R., NORDIN, K. & LABONNE, C. 2011. The F-box protein Ppa is a common regulator of core EMT factors Twist, Snail, Slug, and Sip1. *J Cell Biol*, 194, 17-25.
- LANGER, E. M., FENG, Y., ZHAOYUAN, H., RAUSCHER, F. J., 3RD, KROLL, K. L. & LONGMORE, G. D. 2008. Ajuba LIM proteins are snail/slugs corepressors required for neural crest development in *Xenopus*. *Dev Cell*, 14, 424-36.
- LARCHER, F., BAULUZ, C., DIAZ-GUERRA, M., QUINTANILLA, M., CONTI, C. J., BALLESTIN, C. & JORCANO, J. L. 1992. Aberrant expression of the simple epithelial type II keratin 8 by mouse skin carcinomas but not papillomas. *Mol Carcinog*, 6, 112-21.
- LARUE, L., OHSUGI, M., HIRCHENHAIN, J. & KEMLER, R. 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8263-7.

LEE, M. S., GIPPERT, G. P., SOMAN, K. V., CASE, D. A. & WRIGHT, P. E. 1989. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science*, 245, 635-7.

LEFORT, K. & DOTTO, G. P. 2004. Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression. *Semin Cancer Biol*, 14, 374-86.

LEGUE, E. & NICOLAS, J. F. 2005. Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors. *Development*, 132, 4143-54.

LEVY, V., LINDON, C., HARFE, B. D. & MORGAN, B. A. 2005. Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev Cell*, 9, 855-61.

LIEN, W. H., POLAK, L., LIN, M., LAY, K., ZHENG, D. & FUCHS, E. 2014. In vivo transcriptional governance of hair follicle stem cells by canonical Wnt regulators. *Nat Cell Biol*, 16, 179-90.

LIN, T., PONN, A., HU, X., LAW, B. K. & LU, J. 2010a. Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, 29, 4896-904.

LIN, Y., WU, Y., LI, J., DONG, C., YE, X., CHI, Y. I., EVERS, B. M. & ZHOU, B. P. 2010b. The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *EMBO J*, 29, 1803-16.

LIU, L. K., JIANG, X. Y., ZHOU, X. X., WANG, D. M., SONG, X. L. & JIANG, H. B. 2010. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol*, 23, 213-24.

LIU, Y., LYLE, S., YANG, Z. & COTSARELIS, G. 2003. Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J Invest Dermatol*, 121, 963-8.

MACPHERSON, M. R., MOLINA, P., SOUCHELNYTSKYI, S., WERNSTEDT, C., MARTIN-PEREZ, J., PORTILLO, F. & CANO, A. 2010. Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulators of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A. *Mol Biol Cell*, 21, 244-53.

MALANCHI, I., PEINADO, H., KASSEN, D., HUSSENET, T., METZGER, D., CHAMBON, P., HUBER, M., HOHL, D., CANO, A., BIRCHMEIER, W. & HUELSKEN, J. 2008. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*, 452, 650-3.

- MALANCHI, I., SANTAMARIA-MARTINEZ, A., SUSANTO, E., PENG, H., LEHR, H. A., DELALOYE, J. F. & HUELSKEN, J. 2012. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*, 481, 85-9.
- MANI, S. A., YANG, J., BROOKS, M., SCHWANINGER, G., ZHOU, A., MIURA, N., KUTOK, J. L., HARTWELL, K., RICHARDSON, A. L. & WEINBERG, R. A. 2007. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 10069-74.
- MANSOURI, A., SPURR, N., GOODFELLOW, P. N. & KEMLER, R. 1988. Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin. *Differentiation*, 38, 67-71.
- MANZANARES, M., LOCASCIO, A. & NIETO, M. A. 2001. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet*, 17, 178-81.
- MANZANARES, M., BLANCO, M. J. & NIETO, M. A. 2004. Snail3 orthologues in vertebrates: divergent members of the Snail zinc-finger gene family. *Dev Genes Evol*, 214, 47-53.
- MARETTO, S., CORDENONSI, M., DUPONT, S., BRAGHETTA, P., BROCCOLI, V., HASSAN, A. B., VOLPIN, D., BRESSAN, G. M. & PICCOLO, S. 2003. Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3299-304.
- MARTIN, T. A., GOYAL, A., WATKINS, G. & JIANG, W. G. 2005. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 12, 488-96.
- MARTINEZ-ALVAREZ, C., BLANCO, M. J., PEREZ, R., RABADAN, M. A., APARICIO, M., RESEL, E., MARTINEZ, T. & NIETO, M. A. 2004. Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. *Dev Biol*, 265, 207-18.
- MARTINEZ-ESTRADA, O. M., CULLERES, A., SORIANO, F. X., PEINADO, H., BOLOS, V., MARTINEZ, F. O., REINA, M., CANO, A., FABRE, M. & VILARO, S. 2006. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J*, 394, 449-57.
- MASSI, D. & PANELOS, J. 2012. Notch signaling and the developing skin epidermis. *Adv Exp Med Biol*, 727, 131-41.
- MILLAR, S. E. 2002. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol*,

118, 216-25.

MILLER, J., MCLACHLAN, A. D. & KLUG, A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, 4, 1609-14.

MINGOT, J. M., VEGA, S., MAESTRO, B., SANZ, J. M. & NIETO, M. A. 2009. Characterization of Snail nuclear import pathways as representatives of C2H2 zinc finger transcription factors. *J Cell Sci*, 122, 1452-60.

MINGOT, J. M., VEGA, S., CANO, A., PORTILLO, F. & NIETO, M. A. 2013. eEF1A mediates the nuclear export of SNAG-containing proteins via the Exportin5-aminoacyl-tRNA complex. *Cell Rep*, 5, 727-37.

MOLINA-ORTIZ, P. 2010. Caracterización funcional de Snail2 como represor de cadherina-E y como regulador del proceso de carcinogénesis química. Departamento Bioquímica. Universidad Autónoma de Madrid. Tesis doctoral.

MOLINA-ORTIZ, P., VILLAREJO, A., MACPHERSON, M., SANTOS, V., MONTES, A., SOUCHELNYTSKYI, S., PORTILLO, F. & CANO, A. 2012. Characterization of the SNAG and SLUG domains of Snail2 in the repression of E-cadherin and EMT induction: modulation by serine 4 phosphorylation. *PLoS One*, 7, e36132.

MORENO-BUENO, G., CUBILLO, E., SARRIO, D., PEINADO, H., RODRIGUEZ-PINILLA, S. M., VILLA, S., BOLOS, V., JORDA, M., FABRA, A., PORTILLO, F., PALACIOS, J. & CANO, A. 2006. Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 66, 9543-56.

MORENO-BUENO, G., PEINADO, H., MOLINA, P., OLMEDA, D., CUBILLO, E., SANTOS, V., PALACIOS, J., PORTILLO, F. & CANO, A. 2009. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc*, 4, 1591-613.

MOTZ, G. T. & COUKOS, G. 2013. Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity*, 39, 61-73.

MULLER-ROVER, S., HANDJISKI, B., VAN DER VEEN, C., EICHMULLER, S., FOITZIK, K., MCKAY, I. A., STENN, K. S. & PAUS, R. 2001. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol*, 117, 3-15.

NAGARAJ, S. & GABRILOVICH, D. I. 2007. Myeloid-derived suppressor cells. *Adv Exp Med Biol*, 601,

213-23.

NAKAYAMA, H., SCOTT, I. C. & CROSS, J. C. 1998. The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol*, 199, 150-63.

NASSOUR, M., IDOUX-GILLET, Y., SELMI, A., COME, C., FARALDO, M. L., DEUGNIER, M. A. & SAVAGNER, P. 2012. Slug controls stem/progenitor cell growth dynamics during mammary gland morphogenesis. *PLoS One*, 7, e53498.

NEWKIRK, K. M., DUNCAN, F. J., BRANNICK, E. M., CHANDLER, H. L., PARENT, A. E. & KUSEWITT, D. F. 2008a. The acute cutaneous inflammatory response is attenuated in Slug-knockout mice. *Lab Invest*, 88, 831-41.

NEWKIRK, K. M., MACKENZIE, D. A., BAKALETZ, A. P., HUDSON, L. G. & KUSEWITT, D. F. 2008b. Microarray analysis demonstrates a role for Slug in epidermal homeostasis. *J Invest Dermatol*, 128, 361-9.

NEWKIRK, K. M., PARENT, A. E., FOSSEY, S. L., CHOI, C., CHANDLER, H. L., RAJALA-SCHULTZ, P. J. & KUSEWITT, D. F. 2007. Snai2 expression enhances ultraviolet radiation-induced skin carcinogenesis. *Am J Pathol*, 171, 1629-39.

NGUYEN, B. C., LEFORT, K., MANDINOVA, A., ANTONINI, D., DEVGAN, V., DELLA GATTA, G., KOSTER, M. I., ZHANG, Z., WANG, J., TOMMASI DI VIGNANO, A., KITAJEWSKI, J., CHIORINO, G., ROOP, D. R., MISSERO, C. & DOTTO, G. P. 2006. Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev*, 20, 1028-42.

NICKOLOFF, B. J., QIN, J. Z., CHATURVEDI, V., DENNING, M. F., BONISH, B. & MIELE, L. 2002. Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma. *Cell Death Differ*, 9, 842-55.

NIETO, M. A. 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 155-66.

NIETO, M. A. & CANO, A. 2012. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol*, 22, 361-8.

NISCHT, R., ROOP, D. R., MEHREL, T., YUSPA, S. H., RENTROP, M., WINTER, H. & SCHWEIZER, J. 1988. Aberrant expression during two-stage mouse skin carcinogenesis of a type I 47-kDa keratin, K13, normally associated with terminal differentiation of internal stratified epithelia. *Mol Carcinog*, 1, 96-108.

NOLLET, F., KOOLS, P. & VAN ROY, F. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*, 299, 551-72.

OCAÑA, O. H., CORCOLES, R., FABRA, A., MORENO-BUENO, G., ACLOQUE, H., VEGA, S., BARRALLO-GIMENO, A., CANO, A. & NIETO, M. A. 2012. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*, 22, 709-24.

OKUYAMA, R., TAGAMI, H. & AIBA, S. 2008. Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. *J Dermatol Sci*, 49, 187-94.

OLMEDA, D., JORDA, M., PEINADO, H., FABRA, A. & CANO, A. 2007. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene*, 26, 1862-74.

OLMEDA, D., MONTES, A., MORENO-BUENO, G., FLORES, J. M., PORTILLO, F. & CANO, A. 2008. Snai1 and Snai2 collaborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines. *Oncogene*, 27, 4690-701.

OSHIMORI, N. & FUCHS, E. 2012. Paracrine TGF-beta signaling counterbalances BMP-mediated repression in hair follicle stem cell activation. *Cell Stem Cell*, 10, 63-75.

PABO, C. O., PEISACH, E. & GRANT, R. A. 2001. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem*, 70, 313-40.

PALACIOS, J., BENITO, N., PIZARRO, A., SUAREZ, A., ESPADA, J., CANO, A. & GAMALLO, C. 1995. Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features. *Am J Pathol*, 146, 605-12.

PARENT, A. E., CHOI, C., CAUDY, K., GRIDLEY, T. & KUSEWITT, D. F. 2004. The developmental transcription factor slug is widely expressed in tissues of adult mice. *J Histochem Cytochem*, 52, 959-65.

PARENT, A. E., NEWKIRK, K. M. & KUSEWITT, D. F. 2010. Slug (Snai2) expression during skin and hair follicle development. *J Invest Dermatol*, 130, 1737-9.

PAVLETICH, N. P. & PABO, C. O. 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, 252, 809-17.

PAVLETICH, N. P. & PABO, C. O. 1993. Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science*, 261, 1701-7.

PAZNEKAS, W. A., OKAJIMA, K., SCHERTZER, M., WOOD, S. & JABS, E. W. 1999. Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAI1) and a related processed pseudogene (SNAI1P). *Genomics*, 62, 42-9.

PEINADO, H., PORTILLO, F. & CANO, A. 2004a. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*, 48, 365-75.

PEINADO, H., BALLESTAR, E., ESTELLER, M. & CANO, A. 2004b. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol*, 24, 306-19.

PEINADO, H., DEL CARMEN IGLESIAS-DE LA CRUZ, M., OLMEDA, D., CSISZAR, K., FONG, K. S., VEGA, S., NIETO, M. A., CANO, A. & PORTILLO, F. 2005. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J*, 24, 3446-58.

PEINADO, H., OLMEDA, D. & CANO, A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7, 415-28.

PELLEGRINO, G. R. & BERG, J. M. 1991. Identification and characterization of "zinc-finger" domains by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 671-5.

PEREZ-LOSADA, J., SANCHEZ-MARTIN, M., PEREZ-CARO, M., PEREZ-MANCERA, P. A. & SANCHEZ-GARCIA, I. 2003. The radioresistance biological function of the SCF/kit signaling pathway is mediated by the zinc-finger transcription factor Slug. *Oncogene*, 22, 4205-11.

PEREZ-LOSADA, J., SANCHEZ-MARTIN, M., RODRIGUEZ-GARCIA, A., SANCHEZ, M. L., ORFAO, A., FLORES, T. & SANCHEZ-GARCIA, I. 2002. Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. *Blood*, 100, 1274-86.

PEREZ-MANCERA, P. A., GONZALEZ-HERRERO, I., PEREZ-CARO, M., GUTIERREZ-CIANCA, N., FLORES, T., GUTIERREZ-ADAN, A., PINTADO, B., SANCHEZ-MARTIN, M. & SANCHEZ-GARCIA, I. 2005. SLUG in cancer development. *Oncogene*, 24, 3073-82.

PEREZ-MANCERA, P. A., GONZALEZ-HERRERO, I., MACLEAN, K., TURNER, A. M., YIP, M. Y., SANCHEZ-MARTIN, M., GARCIA, J. L., ROBLEDO, C., FLORES, T., GUTIERREZ-ADAN, A., PINTADO, B. & SANCHEZ-GARCIA, I. 2006. SLUG (SNAI2) overexpression in embryonic development. *Cytogenet Genome Res*, 114, 24-9.

PEREZ-MANCERA, P. A., BERMEJO-RODRIGUEZ, C., GONZALEZ-HERRERO, I., HERRANZ, M., FLORES,

T., JIMENEZ, R. & SANCHEZ-GARCIA, I. 2007. Adipose tissue mass is modulated by SLUG (SNAI2). *Hum Mol Genet*, 16, 2972-86.

PEREZ-MORENO, M. A., LOCASCIO, A., RODRIGO, I., DHONDT, G., PORTILLO, F., NIETO, M. A. & CANO, A. 2001. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem*, 276, 27424-31.

PEREZ, C. J., RUNDHAUG, J. E., JOHNSON, D. G., OBERYSZYN, T. M., TOBER, K. L. & KUSEWITT, D. F. 2014. Slug expression in mouse skin and skin tumors is not regulated by p53. *J Invest Dermatol*, 134, 566-8.

PHILLIPS, S., PRAT, A., SEDIC, M., PROIA, T., WRONSKI, A., MAZUMDAR, S., SKIBINSKI, A., SHIRLEY, S. H., PEROU, C. M., GILL, G., GUPTA, P. B. & KUPERWASSER, C. 2014. Cell-State Transitions Regulated by SLUG Are Critical for Tissue Regeneration and Tumor Initiation. *Stem Cell Reports*, 2, 633-47.

PIOLI, P. D., DAHLEM, T. J., WEIS, J. J. & WEIS, J. H. 2013. Deletion of Snai2 and Snai3 results in impaired physical development compounded by lymphocyte deficiency. *PLoS One*, 8, e69216.

PLIKUS, M. V. 2012. New activators and inhibitors in the hair cycle clock: targeting stem cells' state of competence. *J Invest Dermatol*, 132, 1321-4.

PLIKUS, M. V., MAYER, J. A., DE LA CRUZ, D., BAKER, R. E., MAINI, P. K., MAXSON, R. & CHUONG, C. M. 2008. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature*, 451, 340-4.

POLYAK, K. & WEINBERG, R. A. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*, 9, 265-73.

PSAILA, B. & LYDEN, D. 2009. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*, 9, 285-93.

QIAN, B. Z., LI, J., ZHANG, H., KITAMURA, T., ZHANG, J., CAMPION, L. R., KAISER, E. A., SNYDER, L. A. & POLLARD, J. W. 2011. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, 475, 222-5.

QUINTANILLA, M., BROWN, K., RAMSDEN, M. & BALMAIN, A. 1986. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature*, 322, 78-80.

RENDL, M., LEWIS, L. & FUCHS, E. 2005. Molecular dissection of mesenchymal-epithelial

interactions in the hair follicle. *PLoS Biol*, 3, e331.

RIETHMACHER, D., BRINKMANN, V. & BIRCHMEIER, C. 1995. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 855-9.

RODRIGO, I., CATO, A. C. & CANO, A. 1999. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp Cell Res*, 248, 358-71.

RODRIGUEZ-PUEBLA, M. L., LACAVA, M. & CONTI, C. J. 1999. Cyclin D1 overexpression in mouse epidermis increases cyclin-dependent kinase activity and cell proliferation in vivo but does not affect skin tumor development. *Cell Growth Differ*, 10, 467-72.

RODRIGUEZ, P. C. & OCHOA, A. C. 2008. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev*, 222, 180-91.

SALEEM, S. J. & CONRAD, D. H. 2011. Hematopoietic cytokine-induced transcriptional regulation and Notch signaling as modulators of MDSC expansion. *Int Immunopharmacol*, 11, 808-15.

SARRIO, D., MORENO-BUENO, G., HARDISSON, D., SANCHEZ-ESTEVEZ, C., GUO, M., HERMAN, J. G., GAMALLO, C., ESTELLER, M. & PALACIOS, J. 2003. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int J Cancer*, 106, 208-15.

SAVAGNER, P., KUSEWITT, D. F., CARVER, E. A., MAGNINO, F., CHOI, C., GRIDLEY, T. & HUDSON, L. G. 2005. Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol*, 202, 858-66.

SEEMAN, N. C., ROSENBERG, J. M. & RICH, A. 1976. Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 804-8.

SEFTON, M., SANCHEZ, S. & NIETO, M. A. 1998. Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development*, 125, 3111-21.

SEGAL, D. J., CROTTY, J. W., BHAKTA, M. S., BARBAS, C. F., 3RD & HORTON, N. C. 2006. Structure of Aart, a designed six-finger zinc finger peptide, bound to DNA. *J Mol Biol*, 363, 405-21.

SHI, J., SEVERSON, C., YANG, J., WEDLICH, D. & KLYMKOWSKY, M. W. 2011. Snail2 controls mesodermal BMP/Wnt induction of neural crest. *Development*, 138, 3135-45.

SHI, Y., SAWADA, J., SUI, G., AFFAR EL, B., WHETSTINE, J. R., LAN, F., OGAWA, H., LUKE, M. P., NAKATANI, Y. & SHI, Y. 2003. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*, 422, 735-8.

SHIH, J. Y., TSAI, M. F., CHANG, T. H., CHANG, Y. L., YUAN, A., YU, C. J., LIN, S. B., LIOU, G. Y., LEE, M. L., CHEN, J. J., HONG, T. M., YANG, S. C., SU, J. L., LEE, Y. C. & YANG, P. C. 2005. Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 11, 8070-8.

SHIRLEY, S. H., HUDSON, L. G., HE, J. & KUSEWITT, D. F. 2010. The skinny on Slug. *Mol Carcinog*, 49, 851-61.

SHOOK, D. & KELLER, R. 2003. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev*, 120, 1351-83.

SIDERIDOU, M., ZAKOPOULOU, R., EVANGELOU, K., LIONTOS, M., KOTSINAS, A., RAMPAKAKIS, E., GAGOS, S., KAHATA, K., GRABUSIC, K., GKOUSKOU, K., TROUGAKOS, I. P., KOLETTAS, E., GEORGAKILAS, A. G., VOLAREVIC, S., ELIOPOULOS, A. G., ZANNIS-HADJOPOULOS, M., MOUSTAKAS, A. & GORGOULIS, V. G. 2011. Cdc6 expression represses E-cadherin transcription and activates adjacent replication origins. *J Cell Biol*, 195, 1123-40.

SINHA, P., CLEMENTS, V. K., BUNT, S. K., ALBELDA, S. M. & OSTRAND-ROSENBERG, S. 2007. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol*, 179, 977-83.

SIVERTSEN, S., HADAR, R., ELLOUL, S., VINTMAN, L., BEDROSSIAN, C., REICH, R. & DAVIDSON, B. 2006. Expression of Snail, Slug and Sip1 in malignant mesothelioma effusions is associated with matrix metalloproteinase, but not with cadherin expression. *Lung Cancer*, 54, 309-17.

144 SOBRADO, V. R., MORENO-BUENO, G., CUBILLO, E., HOLT, L. J., NIETO, M. A., PORTILLO, F. & CANO, A. 2009. The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J Cell Sci*, 122, 1014-24.

SORKIN, B. C., HEMPERLY, J. J., EDELMAN, G. M. & CUNNINGHAM, B. A. 1988. Structure of the gene for the liver cell adhesion molecule, L-CAM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 7617-21.

SOU, P. W., DELIC, N. C., HALLIDAY, G. M. & LYONS, J. G. 2010. Snail transcription factors in keratinocytes: Enough to make your skin crawl. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 1940-4.

STENBACK, F. 1980. Skin carcinogenesis as a model system: observations on species, strain and

tissue sensitivity to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene with or without promotion from croton oil. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 46, 89-97.

STRATHDEE, G. 2002. Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol*, 12, 373-9.

SUN, Y., SHAO, L., BAI, H., WANG, Z. Z. & WU, W. S. 2010. Slug deficiency enhances self-renewal of hematopoietic stem cells during hematopoietic regeneration. *Blood*, 115, 1709-17.

SZABOWSKI, A., MAAS-SZABOWSKI, N., ANDRECHT, S., KOLBUS, A., SCHORPP-KISTNER, M., FUSENIG, N. E. & ANGEL, P. 2000. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell*, 103, 745-55.

TAKEICHI, M., HATTA, K., NOSE, A. & NAGAFUCHI, A. 1988. Identification of a gene family of cadherin cell adhesion molecules. *Cell Differ Dev*, 25 Suppl, 91-4.

TAKEICHI, M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem*, 59, 237-52.

TAKEICHI, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251, 1451-5.

TAKEICHI, M. 1994. The cadherin cell adhesion receptor family: roles in multicellular organization and neurogenesis. *Prog Clin Biol Res*, 390, 145-53.

TAMURA, G. 2002. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histol Histopathol*, 17, 323-9.

THIERY, J. P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 442-54.

THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.

THIERY, J. P. & SLEEMAN, J. P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 131-42.

THRASIVOULOU, C., MILLAR, M. & AHMED, A. 2013. Activation of intracellular calcium by multiple Wnt ligands and translocation of beta-catenin into the nucleus: a convergent model of Wnt/Ca²⁺ and Wnt/beta-catenin pathways. *J Biol Chem*, 288, 35651-9.

TRAN, H. T., SEKKALI, B., VAN IMSCHOOT, G., JANSSENS, S. & VLEMINCKX, K. 2010. Wnt/beta-catenin signaling is involved in the induction and maintenance of primitive hematopoiesis in the vertebrate embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 16160-5.

TREMPUS, C. S., MORRIS, R. J., EHINGER, M., ELMORE, A., BORTNER, C. D., ITO, M., COTSARELIS, G., NIJHOF, J. G., PECKHAM, J., FLAGLER, N., KISSLING, G., HUMBLE, M. M., KING, L. C., ADAMS, L. D., DESAI, D., AMIN, S. & TENNANT, R. W. 2007. CD34 expression by hair follicle stem cells is required for skin tumor development in mice. *Cancer Res*, 67, 4173-81.

TRIBULO, C., AYBAR, M. J., SANCHEZ, S. S. & MAYOR, R. 2004. A balance between the anti-apoptotic activity of Slug and the apoptotic activity of msx1 is required for the proper development of the neural crest. *Dev Biol*, 275, 325-42.

TRIPATHI, M. K., MISRA, S., KHEDKAR, S. V., HAMILTON, N., IRVIN-WILSON, C., SHARAN, C., SEALY, L. & CHAUDHURI, G. 2005. Regulation of BRCA2 gene expression by the SLUG repressor protein in human breast cells. *J Biol Chem*, 280, 17163-71.

TSAI, J. H., DONAHER, J. L., MURPHY, D. A., CHAU, S. & YANG, J. 2012. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*, 22, 725-36.

UCHIKADO, Y., NATSUGOE, S., OKUMURA, H., SETOYAMA, T., MATSUMOTO, M., ISHIGAMI, S. & AIKOU, T. 2005. Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 11, 1174-80.

VALASTYAN, S. & WEINBERG, R. A. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275-92.

VAN ROY, F. 2014. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer*, 14, 121-34.

VANDEWALLE, C., VAN ROY, F. & BERX, G. 2009. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci*, 66, 773-87.

VERNON, A. E. & LABONNE, C. 2006. Slug stability is dynamically regulated during neural crest development by the F-box protein Ppa. *Development*, 133, 3359-70.

VILLAREJO, A., CORTES-CABRERA, A., MOLINA-ORTIZ, P., PORTILLO, F. & CANO, A. 2014. Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal

transition. *J Biol Chem*, 289, 930-41.

VIÑAS-CASTELLS, R., BELTRAN, M., VALLS, G., GOMEZ, I., GARCIA, J. M., MONTSERRAT-SENTIS, B., BAULIDA, J., BONILLA, F., DE HERREROS, A. G. & DIAZ, V. M. 2010. The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation. *J Biol Chem*, 285, 3794-805.

VIÑAS-CASTELLS, R., FRIAS, A., ROBLES-LANUZA, E., ZHANG, K., LONGMORE, G. D., GARCIA DE HERREROS, A. & DIAZ, V. M. 2014. Nuclear ubiquitination by FBXL5 modulates Snail1 DNA binding and stability. *Nucleic Acids Res*, 42, 1079-94.

VITALI, R., MANCINI, C., CESI, V., TANNO, B., MANCUSO, M., BOSSI, G., ZHANG, Y., MARTINEZ, R. V., CALABRETTA, B., DOMINICI, C. & RASCHELLA, G. 2008. Slug (SNAI2) down-regulation by RNA interference facilitates apoptosis and inhibits invasive growth in neuroblastoma preclinical models. *Clin Cancer Res*, 14, 4622-30.

WANG, S. P., WANG, W. L., CHANG, Y. L., WU, C. T., CHAO, Y. C., KAO, S. H., YUAN, A., LIN, C. W., YANG, S. C., CHAN, W. K., LI, K. C., HONG, T. M. & YANG, P. C. 2009. p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol*, 11, 694-704.

WANG, X., ZHENG, M., LIU, G., XIA, W., MCKEOWN-LONGO, P. J., HUNG, M. C. & ZHAO, J. 2007. Kruppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res*, 67, 7184-93.

WATT, F. M., ESTRACH, S. & AMBLER, C. A. 2008. Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 171-9.

WOLFE, S. A., NEKLUDOVA, L. & PABO, C. O. 2000. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29, 183-212.

WU, W. S., HEINRICHS, S., XU, D., GARRISON, S. P., ZAMBETTI, G. P., ADAMS, J. M. & LOOK, A. T. 2005. Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell*, 123, 641-53.

YAMASAKI, H., SEKIMOTO, T., OHKUBO, T., DOUCHI, T., NAGATA, Y., OZAWA, M. & YONEDA, Y. 2005. Zinc finger domain of Snail functions as a nuclear localization signal for importin beta-mediated nuclear import pathway. *Genes Cells*, 10, 455-64.

YANG, J., MANI, S. A., DONAHER, J. L., RAMASWAMY, S., ITZYKSON, R. A., COME, C., SAVAGNER, P., GITELMAN, I., RICHARDSON, A. & WEINBERG, R. A. 2004. Twist, a master regulator of morphogen-

esis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117, 927-39.

YANG, Z., RAYALA, S., NGUYEN, D., VADLAMUDI, R. K., CHEN, S. & KUMAR, R. 2005. Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res*, 65, 3179-84.

YAP, A. S., BRIEHER, W. M. & GUMBINER, B. M. 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 119-46.

YOOK, J. I., LI, X. Y., OTA, I., FEARON, E. R. & WEISS, S. J. 2005. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem*, 280, 11740-8.

YOUSSEF, K. K., LAPOUGE, G., BOUVREE, K., RORIVE, S., BROHEE, S., APPELSTEIN, O., LARSIMONT, J. C., SUKUMARAN, V., VAN DE SANDE, B., PUCCI, D., DEKONINCK, S., BERTHE, J. V., AERTS, S., SALMON, I., DEL MARMOL, V. & BLANPAIN, C. 2012. Adult interfollicular tumour-initiating cells are reprogrammed into an embryonic hair follicle progenitor-like fate during basal cell carcinoma initiation. *Nat Cell Biol*, 14, 1282-94.

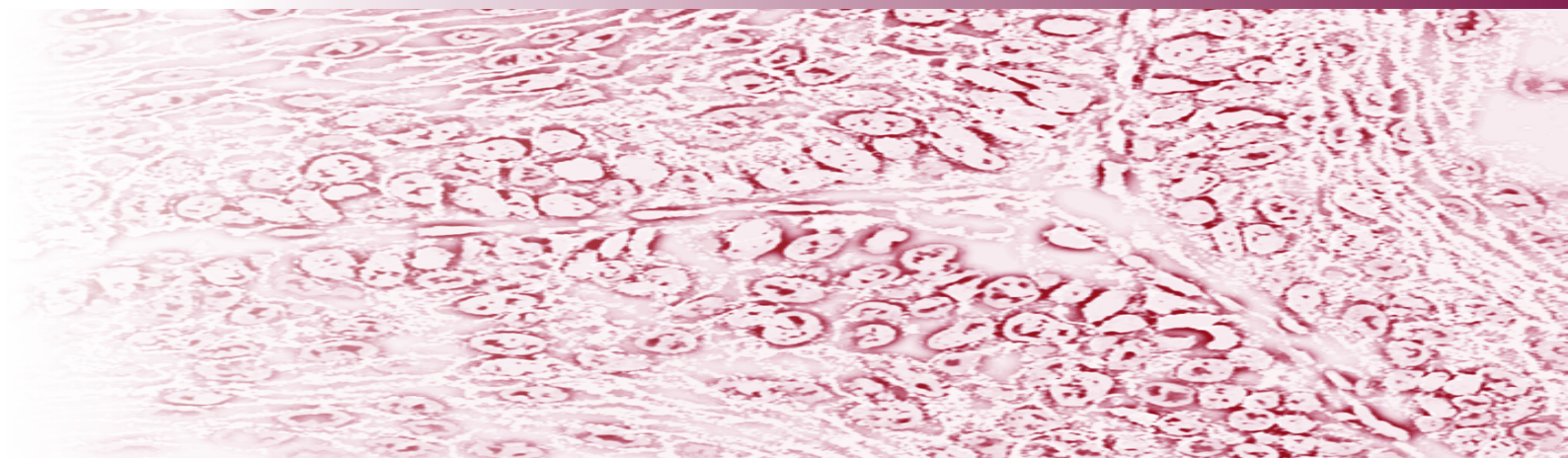
YUSPA, S. H. 1994. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis--thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res*, 54, 1178-89.

YUSPA, S. H., DLUGOSZ, A. A., DENNING, M. F. & GLICK, A. B. 1996. Multistage carcinogenesis in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 1, 147-50.

ZHANG, K., RODRIGUEZ-AZNAR, E., YABUTA, N., OWEN, R. J., MINGOT, J. M., NOJIMA, H., NIETO, M. A. & LONGMORE, G. D. 2012. Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *EMBO J*, 31, 29-43.

ZHENG, L., BAUMANN, U. & REYMOND, J. L. 2004. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res*, 32, e115.

ZHOU, B. P., DENG, J., XIA, W., XU, J., LI, Y. M., GUNDUZ, M. & HUNG, M. C. 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, 6, 931-40.



Durante el desarrollo de la tesis parte del trabajo llevado a cabo por el doctorando ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Autores: Patricia Molina-Ortiz*, Ana Villarejo*, Matthew MacPherson, Vanesa Santos, Amalia Montes, Serghey Souchelnytskyi, Francisco Portillo and Amparo Cano.

* Equal contribution

Título: Characterization of the SNAG and SLUG domains of Snail2 in the repression of E-cadherin and EMT induction. Modulation by serine 4 phosphorylation.

Referencia: PLoS One. 2012;7(5):e36132.

Autores: Ana Villarejo, Alvaro Cortes-Cabrera, Patricia Molina-Ortiz, Francisco Portillo and Amparo Cano.

Título: Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and Epithelial to Mesenchymal Transition.

Referencia: J Biol Chem. 2014 Jan 10;289(2):930-41.

